



**Ana Patricia Amaro
Melo Silva**

**Efeito do meio de cultura na produção de
ramnolípidos bacterianos**



**Ana Patricia Amaro
Melo Silva**

**Efeito do meio de cultura na produção de
ramnolípidos bacterianos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Doutor Newton Carlos Marcial Gomes, Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha mãe por todo o esforço e apoio.

o júri

Presidente

Prof.^a Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal

Prof.^a Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal

Doutor. Newton Carlos Marcial Gomes
Investigador auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

Vogal

Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado
Investigador auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Professora Doutora Ângela Cunha por toda a disponibilidade, incentivo e ideias indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Gil Maçarico, por facultar a ALA (água de lavagem de azeitonas), essencial para este trabalho.

Ao Professor Jorge Saraiva e aos seus alunos Mauro Santos e Liliana Fidalgo pela análise de caracterização química feita à ALA.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Ascensão Ravara por toda a disponibilidade e ajuda com a lupa e à Luciana Génio.

À Professora Doutora Diana Pinto pelo reagente de orcinol indispensável para a realização deste trabalho.

À Vanessa Oliveira por toda a disponibilidade e colaboração.

Aos colegas de laboratório por todos momentos de descontração/diversão que também foram essenciais, não preciso nomear vocês sabem quem são.

Aos amigos que indiretamente também participaram neste processo, pelo apoio incondicional, a paciência e compreensão.

palavras-chave

biossurfactantes, água de lavagem de azeitonas, *Pseudomonas*, salinidade, nutrientes

resumo

A síntese de biossurfactantes é um dos mecanismos de sobrevivência comum em microrganismos de interfaces ambientais. Algumas das espécies produtoras são capazes de crescer em matérias primas de baixo custo, designadamente resíduos ou sub-produtos industriais e óleos vegetais. As águas russas, são efluentes resultantes da indústria de produção de azeite e azeitona de mesa. Caracterizam-se por uma elevada carga orgânica associada e contêm concentrações apreciáveis de lípidos e de compostos fenólicos. O mecanismo de produção dos biossurfactantes é limitado por vários factores como a qualidade e a quantidade da fonte de carbono presente, as condições do meio onde se encontra, o pH, a temperatura e a salinidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de utilizar este tipo de água residual como substrato para o crescimento de *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes previamente isoladas do ambiente.

As estirpes usadas foram inicialmente caracterizadas quanto ao seu potencial para degradar substratos poliméricos por análise da atividade enzimática extracelular. O crescimento bacteriano e a produção de biossurfactantes foram avaliados após cultivo em meio não suplementado ou suplementado com fontes adicionais de carbono, azoto e fósforo. Paralelamente, avaliou-se também o efeito da salinidade no crescimento das estirpes selecionadas e na produção de ramnolípidos.

Os resultados permitem concluir que é necessário o enriquecimento da água de lavagem com fontes adicionais de carbono para que o crescimento bacteriano ocorra e se verifique produção de biossurfactantes. A adição de uma fonte de azoto resultou numa estimulação adicional do crescimento. Verificou-se ainda que a concentração de sal é um fator determinante do desempenho das estirpes produtoras de biossurfactantes, havendo uma relação inversa entre a salinidade do meio de cultura e a quantidade de biossurfactante produzida.

Os resultados permitem concluir que é possível usar água de lavagem de azeitona como meio-base para o cultivo de bactérias produtoras de biossurfactantes desde que o teor de sal seja baixo ou, possa ser reduzido por diluição, e sejam adicionadas fontes suplementares de carbono e azoto.

keywords

biosurfactants, olive mill wastewater, *Pseudomonas*, salinity, nutrients.

abstract

The biosynthesis of biosurfactants is one of the most common mechanisms of survival of bacteria in interface environments. Some of the strains in which this capacity has been demonstrated can grow in low-cost substrates such as agro-industrial residues and vegetal oil wastes. Olive mill wastewaters are effluents that result from olive oil, and olive fruit industry. They are characterized by a high content in organic matter, and contain relatively high concentration of lipids and phenolic compounds. However, biosurfactant production is limited by several factors, such as the quality and quantity of carbon, conditions of pH, temperature and salinity of the culture medium.

The objective of this work was to assess the suitability of a non-conventional substrate (olive industry wastewater) as a basal-medium for the growth of biosurfactant-producing *Pseudomonads*.

A set of biosurfactant producing *Pseudomonas* strains previously isolated from Ria de Aveiro was initially characterized to their potential for polymer hydrolysis (rates of extracellular enzymatic activity). Bacterial growth and rhamnolipid production was investigated upon cultivation in supplemented and unsupplemented media. In parallel, the effect of salinity on growth and rhamnolipid production was also evaluated.

Results indicate that carbon supplements to olive industry wastewater may be required for the growth of the tested strains and for the production of rhamnolipids. Also, nitrogen supplements caused a further stimulation of growth. Salinity significantly affected the performance of tested strains and biosurfactant production showed an inverse relation with the concentration of salt in the culture medium.

The wastewater resulting from the process of table olive production can, in fact, be used as a lipid-rich substrate for the growth of biosurfactant producing *Pseudomonads*, but dilution may be required in the case of high-salinity wastewaters to reduce the concentration of salt, and supplementation with additional carbon and nitrogen sources is required for efficient rhamnolipid production.

Índice

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE TABELAS..... | X |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| COMPOSTOS TENSIOACTIVOS | 1 |
| MICROORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES | 3 |
| BIOSSURFACTANTES BACTERIANOS | 5 |
| GLICOLÍPIDOS E RAMNOLÍPIDOS..... | 7 |
| APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES MICROBIANOS | 9 |
| SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS PARA O CULTIVO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES | 10 |
| ÁGUA DE LAVAGEM DE AZEITONA | 11 |
| OBJECTIVOS | 13 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| MICROORGANISMOS | 17 |
| AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR | 17 |
| EFEITO DA SALINIDADE NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES | 19 |
| AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDOS EM MEIOS FORMULADOS A PARTIR DE ÁGUA DE LAVAGEM DE AZEITONA | 20 |
| COLHEITA E CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DE LAVAGEM DE AZEITONA..... | 20 |
| PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA..... | 21 |
| CURVAS DE CRESCIMENTO | 22 |
| QUANTIFICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE | 22 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA | 23 |
| RESULTADOS | 27 |
| ATIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR..... | 27 |
| EFEITO DA SALINIDADE NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE..... | 27 |
| CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ÁGUA DE LAVAGEM DE AZEITONA | 28 |
| CRESCIMENTO EM MEIOS FORMULADOS A PARTIR DE ÁGUA DE LAVAGEM DE AZEITONA..... | 28 |
| ISOLADO 5- <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> | 29 |
| ISOLADO 7- <i>PSEUDOMONAS SP.</i> | 32 |
| ISOLADO 27- <i>PSEUDOMONAS SP.</i> | 35 |
| ISOLADO 74- <i>PSEUDOMONAS SP.</i> | 38 |
| PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDOS EM MEIOS DE ÁGUA DE AZEITONA | 42 |
| DISCUSSÃO..... | 47 |
| AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA EXTRACELULAR | 47 |
| CRESCIMENTO EM MEIOS DE ÁGUA DE AZEITONA | 48 |
| PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDOS EM MEIOS DE ÁGUA DE AZEITONA | 49 |
| EFEITO DA SALINIDADE NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE..... | 51 |
| CONCLUSÃO | 55 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1- EFEITO DOS SURFACTANTES EM ÁGUA. | 1 |
| FIGURA 2- FORMAÇÃO DE MICELAS..... | 2 |
| FIGURA 3- ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS BIOSSURFACTANTES MICROBIANOS..... | 6 |
| FIGURA 4 – ESQUEMA DAS VIAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDOS (WITTGENS ET AL, 2011). | 8 |
| FIGURA 5- PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDOS EM MEIO DE CULTURA COM CONCENTRAÇÕES DE SAL DE 0 A 30 gL ⁻¹ | 28 |
| FIGURA 6 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 5 (<i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 29 |
| FIGURA 7 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 5 (<i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 30 |
| FIGURA 8- TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 5 NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. APENAS ESTÃO REPRESENTADAS OS VALORES CALCULADOS PARA OS MEIOS DE CULTURA EM QUE SE OBSERVOU CRESCIMENTO (MEIOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE LEVEDURA). ... | 30 |
| FIGURA 9 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 5 (<i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO | 31 |
| FIGURA 10 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 5 (<i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO | 32 |
| FIGURA 11 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 7 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 33 |
| FIGURA 12 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 7 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 33 |
| FIGURA 13- TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 7 NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. APENAS ESTÃO REPRESENTADAS OS VALORES CALCULADOS PARA OS MEIOS DE CULTURA EM QUE SE OBSERVOU CRESCIMENTO (MEIOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE LEVEDURA). ... | 34 |
| FIGURA 14 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 7 (<i>PSEUDOMONAS SP</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 34 |
| FIGURA 15 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 7 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 35 |
| FIGURA 16 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 27 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 36 |
| FIGURA 17 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 27 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 36 |
| FIGURA 18- TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 27 NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. APENAS ESTÃO REPRESENTADAS OS VALORES CALCULADOS PARA OS MEIOS DE CULTURA EM QUE SE OBSERVOU CRESCIMENTO (MEIOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE LEVEDURA). ... | 37 |
| FIGURA 19 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 27 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO | 37 |
| FIGURA 20 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 27 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO | 38 |
| FIGURA 21 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 74 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 39 |
| FIGURA 22 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 74 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA COM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO. | 39 |
| FIGURA 23- TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 74 NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. APENAS ESTÃO REPRESENTADAS OS VALORES CALCULADOS PARA OS MEIOS DE CULTURA EM QUE SE OBSERVOU CRESCIMENTO (MEIOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE LEVEDURA). ... | 40 |
| FIGURA 24 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 74 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ½ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO | 40 |
| FIGURA 25 – CURVAS DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 74 (<i>PSEUDOMONAS SP.</i>) CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO ¼ DE ALA SEM ADIÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE SUPLEMENTAR DE FONTE DE CARBONO | 41 |
| FIGURA 26- COMPARAÇÃO DA TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA COM BASE NAS CURVAS DE CRESCIMENTO DOS DIFERENTES ISOLADOS. | 42 |
| FIGURA 27- MÉTODO DO COLAPSO DA GOTA: EFEITO DA REDUÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL. | 43 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - BIOSSURFACTANTES BACTERIANOS MAIS COMUNS (NITSCHKE <i>ET AL</i> ,2002)..... | 4 |
| TABELA 2- IDENTIFICAÇÃO E ORIGEM DAS ESTIRPES DE <i>PSEUDOMONAS</i> PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES USADAS NESTE ESTUDO. | 17 |
| TABELA 3- FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA REPRESENTANDO VÁRIAS CONDIÇÕES DE DISPONIBILIDADE NUTRICIONAL. ALA - ÁGUA DE LAVAGEM DE AZEITONA. | 21 |
| TABELA 4- TAXA MÁXIMA DE ATIVIDADE DE SEIS ENZIMAS EXTRACELULARES AVALIADA EM SUSPENSÕES DOS ISOLADOS 5, 7, 27 E 74 COM RECURSO A SUBSTRATOS MODELO FLUOROGÊNICOS.VALORES MÉDIOS DE 3 RÉPLICAS ANALÍTICAS \pm DESVIO PADRÃO. | 27 |
| TABELA 5 - PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS ISOLADOS 5, 7, 24 E 74 CULTIVADOS EM MEIOS PREPARADOS COM ALA, AVALIADA DIRETAMENTE PELO MÉTODO DO ORCINOL (EQUIVALENTES DE RAMNOSE) E PELO MÉTODO DO COLAPSO DA GOTA (EQUIVALENTES DE SDS). VALORES MÉDIOS DE 3 RÉPLICAS ANALÍTICAS. | 43 |

Introdução

Introdução

Compostos tensioativos

A palavra surfactante deriva do termo inglês (surfactant), ou seja, “surface active agent”, sendo esta designação atribuída aos compostos/moléculas que devido à sua estrutura anfipática (combinação de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos) apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial entre fluídos, ou entre estes e uma superfície sólida (Rosen, 1978, Martins *et al*, 2008).

A tensão superficial (Figura 1) é a resistência que atua na superfície de um líquido em repouso, resultante das forças intermoleculares presentes nas moléculas que constituem o líquido. Cada molécula exerce uma força atrativa sobre as restantes, sendo que à superfície, este campo atrativo é mais reduzido verificando-se apenas o efeito das moléculas vizinhas.

A água apresenta um valor elevado de tensão superficial - 72 mN/m, devido à presença de pontes de hidrogénio que constituem as forças intermoleculares mais fortes (Costa e Nitschke, 2010).

Um dos mecanismos de sobrevivência mais comum em microrganismos que colonizam interfaces ambientais é a produção de biossurfactantes (Van Hamme *et al*, 2006). Os biossurfactantes têm vindo a despertar atenção em resultado do reconhecimento das suas propriedades únicas, nomeadamente quanto aos custos e condições de produção, menor toxicidade e maior biodegradabilidade, relativamente aos homólogos químicos produzidos sinteticamente. Estas propriedades conferem uma redução no impacto ambiental, uma vez, que aditivos químicos são substituídos por biossurfactantes (Hommel, 1990, Volkering *et al*, 1995).

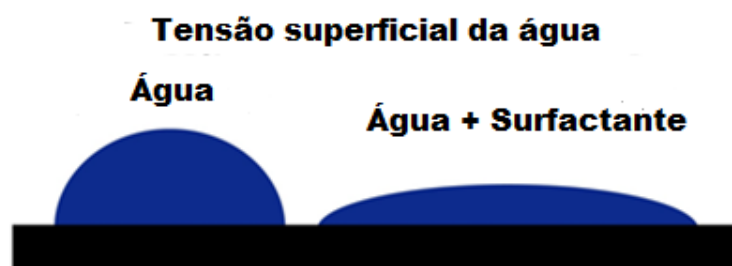


Figura 1- Efeito dos surfactantes em água.

(<http://commercial-cleaning-products.com/cleaning-chemicals/chemistry-works-how-do-cleaning-products-work/>)

Os biossurfactantes apresentam uma estrutura anfipática de baixo peso molecular, em que o domínio hidrofóbico é constituído por uma longa cauda de ácidos gordos ou uma cauda de ácidos gordos hidroxilados de tamanho variável. O domínio hidrofílico pode ser constituído por um ácido carboxílico, um aminoácido, um péptido ou um álcool (Van Hamme *et al*, 2006, Yng *et al*, 2006, Lu *et al*, 2007). A sua classificação é feita de acordo com a carga iónica presente na parte polar da molécula, existindo biossurfactantes catiónicos, aniónicos, não iónicos e anfotéricos. Estes últimos apresentam cargas negativas e positivas na mesma molécula. Ao possuir domínios hidrofóbicos e hidrofílicos na mesma molécula, os biossurfactantes são capazes da dissolução de óleo em água e água em óleo através da redução da tensão superficial (Showell, 2006, Van Hamme *et al*, 2006, Banat *et al*, 2010).

A concentração micelar crítica (CMC) é uma propriedade característica de cada composto, sendo esta também uma forma de quantificar a sua eficiência enquanto agente tensioativo. Define-se como a concentração mínima a partir da qual a formação de estruturas agregadas em solução, micelas, é facilitada. Este valor traduz a proporção água/surfactante na qual a tensão superficial, não sofre alterações, ultrapassado esse limite, verifica-se a associação dos compostos em vesículas ou micelas. A formação de micelas confere ao biossurfactante a capacidade de redução da tensão

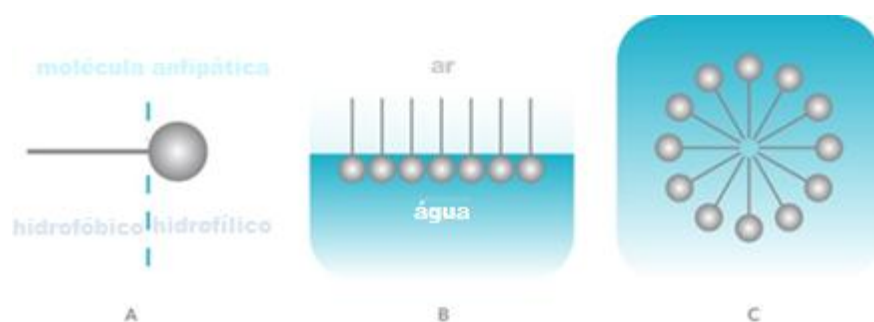


Figura 2- Formação de micelas.

a) Moléculas que contêm ambos os domínios são designadas de anfipáticas, b) Uma molécula anfipática pode organizar-se à superfície da água, de modo a que a parte polar interage com a água e a parte não polar é mantida acima da superfície, c) Outro arranjo destas moléculas pode permitir que cada componente para interagir com o seu ambiente de uma forma favorecida forme uma micela esférica (<http://www.attension.com/critical-micelle-concentration>).

superficial/interfacial, por associação da sua parte hidrofílica com as moléculas de água, a parte hidrofóbica fica assim, retida no interior do agregado, aumentando desta forma a solubilidade e biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos (Figura 2) (Contiero, 2008).

A temperatura, a força iónica e o pH são factores que afectam a CMC, sendo que valores inferiores de CMC correspondem a uma maior eficiência do biossurfactante (Contiero, 2008, Fard *et al*, 2010, Pacwa-Płociniczak *et al*, 2011). Relativamente aos seus análogos químicos, os biossurfactantes para além de outras vantagens, apresentam-se como mais eficientes, dado que os seus valores de CMC são cerca de 10 a 40 vezes menores (Pacwa-Płociniczak *et al*, 2011).

Os biossurfactantes microbianos são normalmente metabolitos secundários, produzidos no final da fase logarítmica ou no início da fase estacionária e podem encontrar-se sob a forma de moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas ou permanecerem associados à sua superfície (Pattanathu *et al*, 2008, Nawawi *et al*, 2010). Os biossurfactantes conferem aos organismos produtores vantagens adaptativas, relativamente a condições ambientais extremas características de alguns micro-nichos ecológicos, como biofilmes ou substratos hidrofóbicos (Ron *et al*, 2001). Este tipo de compostos está ainda envolvido nos processos de regulação dos mecanismos de adesão às superfícies quer nas respostas de *quorum sensing*. A inibição microbiana, a estabilização de biofilmes e a quelação de metais, são algumas das propriedades dos biossurfactantes (Ron *et al*, 2001).

Microrganismos produtores de biossurfactantes

A síntese de biossurfactantes é uma capacidade presente numa grande diversidade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos, sendo as propriedades e o modo de ação de cada biossurfactante característicos da espécie que o produz. Na tabela 1, é apresentada uma lista dos biossurfactantes mais comuns e dos microrganismos que os produzem (Nitschke *et al*, 2002).

Tabela 1 - Biossurfactantes bacterianos mais comuns (Nitschke *et al*, 2002).

| Tipo de Biossurfactante | Microrganismo |
|--|---|
| Glicolípidos | |
| ramnolípidos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| soforolípidos | <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> |
| trehalolípidos | <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> |
| Lipopeptídeos e lipoproteínas | |
| Peptídeo-lípido | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| Viscosina | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| Serravetina | <i>Serratia marcescens</i> |
| Surfactina | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Subtilisina | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Gramicidina | <i>Bacillus brevis</i> |
| Polimixina | <i>Bacillus polymyxa</i> |
| Ácidos gordos, lípidos neutros e fosfolípidos | |
| Ácidos gordos | <i>Corynebacterium lepus</i> |
| Lípidos neutros | <i>Nocardia erythropolis</i> |
| Fosfolípidos | <i>Thiobacillus thiooxidans</i> |
| Surfactantes poliméricos | |
| Emulsan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| Biodispersan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| Liposan | <i>Candida lipolytica</i> |
| Carbohidrato-lípido-proteína | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| Manana-lípido-proteína | <i>Candida tropicalis</i> |
| Surfactantes particulados | |
| Vesículas | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |

Estas bactérias ocorrem nomeadamente em locais com elevada contaminação de hidrocarbonetos ou com resíduos orgânicos de elevado teor lipídico, e alguns destes microrganismos têm a capacidade de usar estes substratos hidrofóbicos como única fonte de carbono (Pryia *et al*, 2009) Geralmente, zonas portuárias, complexos industriais ou

áreas envoltoras de explorações de petróleo são zonas onde as bactérias produtoras de biossurfactantes têm sido frequentemente isoladas (Christofi *et al*, 2002, Bento *et al*, 2005, Maneerat, 2005; Wei *et al*, 2005, Saravanan *et al*, 2012). Existem ainda relatos de isolamento de estirpes produtoras de biossurfactantes, em unidades de processamento de produtos alimentares, em fontes hidrotermais, em reservatórios de combustível de aviões (Enfors *et al*, 1979, Persson *et al*, 1987).

Para o isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes aplica-se normalmente a estratégia de cultivo em meios seletivos que possuem como única fonte de carbono substratos altamente hidrofóbicos, como por exemplo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Têm sido isoladas espécies pertencentes aos géneros *Rhodococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* em meios de cultura contendo substratos hidrofóbicos como fontes de carbono, nomeadamente, biodiesel, crude ou óleo de refinarias (Nitschke *et al*, 2002).

Biossurfactantes bacterianos

Os biossurfactantes bacterianos (Figura 3) incluem uma vasta gama de compostos tais como os glicolípidos, lipopeptídeos (LPs), polissacarídeos, complexos proteicos de polissacarídeos, fosfolípidos, ácidos gordos e lípidos neutros (Lin *et al*, 1998).

O grupo dos lipopeptídeos, no qual se inclui a surfactina produzida por *Bacillus*, resulta da combinação de ácidos gordos com uma cadeia de aminoácidos. A surfactina, é um lipopeptídeo cíclico (CLPB, *cyclic lipopeptide biosurfactant*), que resulta da combinação de uma cadeia de ácido gordo com um anel peptídico de sete aminoácidos (L-asparagina, glicina, duas moléculas de L-leucina, L-valina e duas moléculas L-leucina) (Davis *et al*, 1999; Barros *et al*, 2007).

Os fosfolípidos são componentes da membrana celular. Resultam da combinação de um grupo fosfato com ácidos gordos e são produzidos por várias bactérias e algumas leveduras como *Arthrobacter sp.* e *Thiobacillus thiooxidans*, quando cultivadas em substratos hidrofóbicos (Desai e Banat, 1997)

Os biosurfactantes poliméricos consistem de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas e são moléculas complexas. A maioria dos biosurfactantes poliméricos, como o emulsan, tem uma estrutura com uma cadeia repetitiva de três ou quatro açúcares agregados com um ácido grúdo (Rosenberg *et al*, 1997).

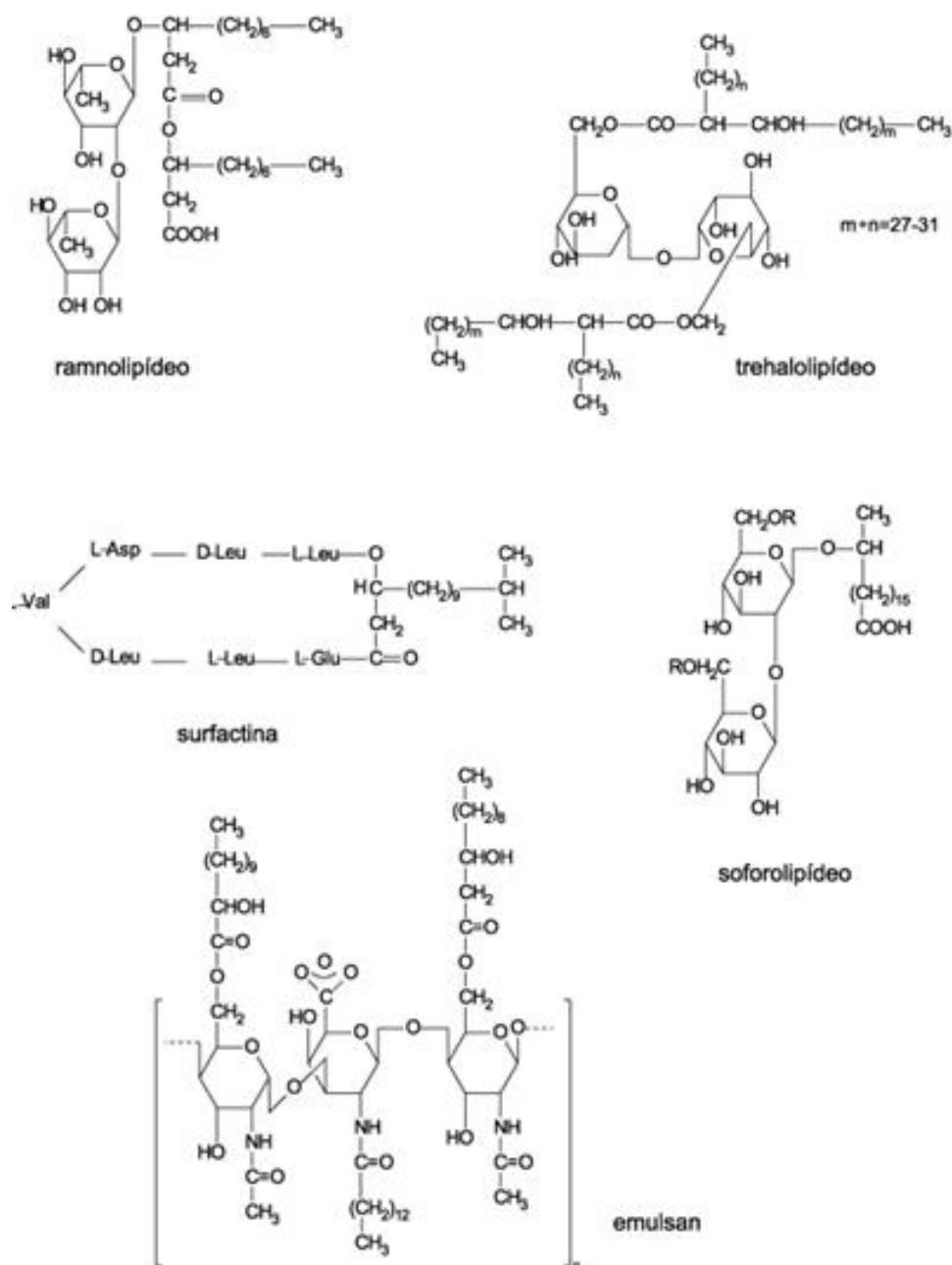


Figura 3- Estrutura química de alguns biosurfactantes microbianos (Nitschke *et al*,2002).

Glicolípidos e ramnolípidos

Os glicolípidos resultam da combinação de hidratos de carbono com uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Os mais conhecidos de todos os glicolípidos são os ramnolípidos, que possuem um domínio hidrofílico constituído por açúcares de ramnose e uma porção hidrofóbica constituída por ácidos gordos (Wang *et al*, 2007, Kitamoto *et al*, 2009).

Os ramnolípidos têm sido estudados extensivamente. São metabolitos secundários produzidos como uma mistura de proporções variáveis de compostos contendo uma (mono-ramnolípidos) ou duas (di-ramnolípidos) ramnoses acopladas ao ácido β -hidroxidecanoico (Ballot, 2009). Estes compostos aniónicos não são voláteis, e são solúveis em água em pH entre 6,5 e 7,5 mas são hidrolisados rapidamente em pH extremo. Mantêm-se estáveis entre a temperatura ambiente e 121 °C (Kronemberger, 2007).

Os ramnolípidos produzidos por *Pseudomonas* têm sido tradicionalmente referidos como misturas dos homólogos do tipo 1 com a fórmula molecular $C_{26}H_{48}O_9$, com os de tipo 2 com a fórmula molecular $C_{32}H_{58}O_{13}$, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, respectivamente (Kronemberger, 2007, Ballot, 2009). O tamanho das cadeias de ácidos gordos varia significativamente, aumentando a diversidade de combinações possíveis, sendo predominantes as cadeias de C8 a C12. O açúcar liga-se ao grupo hidroxilo de uma das moléculas do ácido por uma ligação glicosídica (Ballot, 2009, Costa e Nitschke, 2010).

O tipo de ramnolípidos produzido é dependente da estirpe bacteriana e a sua acumulação no sobrenadante inicia-se no fim da fase logarítmica (Robert *et al*, 1989, Mulligan e Gibbs, 1993). Enquanto um anel de ramnose extra aumenta a capacidade hidrofílica do ramnolípidos a existência de carbonos adicionais na cadeia de ácidos gordos resultam num aumento da sua hidrofobicidade. Estas propriedades podem comprometer a estabilidade do ramnolípidos na fase aquosa, a sua capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos e consequentemente a biodisponibilidade dos mesmos (Mata-Sandoval *et al*, 1999).

A formação de ramnolípidos ocorre através de reações sequenciais de transferência do grupo glicosil, cada uma catalisada por uma ramnosiltransferase específica, funcionando a timidinadifosfo-L-ramnose (TDP-ramnose) como dador de ramnosil e o alcenoato como seu aceitador (Maier *et al*, 2000).

A biossíntese inicia-se com a junção de uma unidade de acetil-CoA com a cadeia de ácidos gordos resultantes da síntese de novo dos ácidos gordos formando-se o β -hidroxidecanoato. A ação da ramnosiltransferase I não se restringe só à produção de mono-ramnolípidos, sendo esta enzima também responsável pela formação de um dímero HAA (β -hidroxi(deca)noil- β -hidroxi(deca)noato). Esta enzima codificada pelos genes *rhIA* e *rhIB*, forma um complexo enzimático ativo que se localiza na membrana citoplasmática: a proteína RhIA restringe-se ao periplasma e a proteína RhIB atravessa a membrana de forma a poder catalisar a adesão de um HAA a uma molécula de L-ramnose, resultando na formação dos mono-ramnolípidos (Soberón-Chávez *et al*, 2005; Kronemberger, 2007, Ballot, 2009). O gene *rhIC* codifica a enzima ramnosiltransferase II, sendo esta responsável pela etapa final deste processo que corresponde à transferência de uma molécula adicional de ramnose à molécula de ramnolípido formado anteriormente, originando um di-ramnolípido (Soberón-Chávez *et al*, 2005, Wittgens *et al*, 2011) (Figura 4).

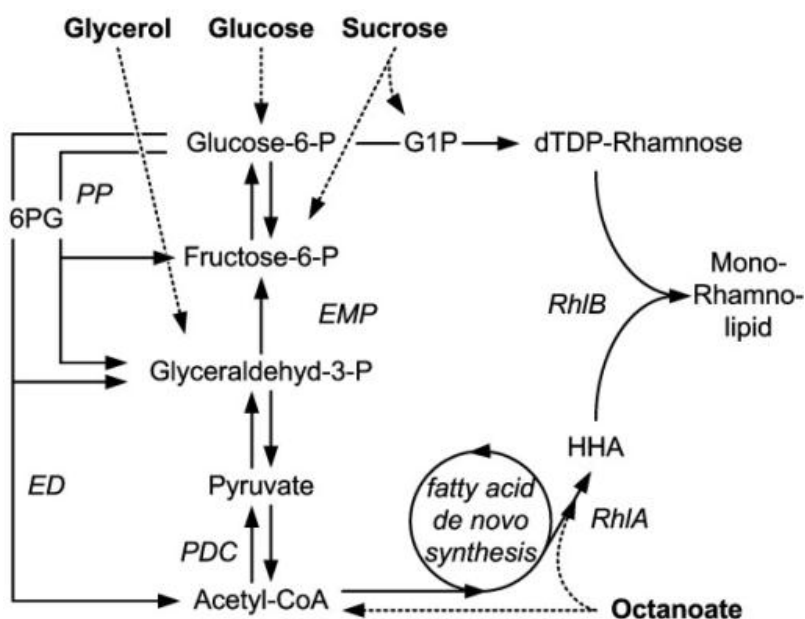


Figura 4 – Esquema das vias utilizadas para a produção de ramnolípidos (Wittgens *et al*, 2011).

Aplicações dos biossurfactantes microbianos

Os biossurfactantes microbianos são uma alternativa viável aos seus análogos químicos por apresentarem algumas características vantajosas (Makkar *et al*, 2002). Possuem a capacidade de aumentar a área superficial de substratos insolúveis em água por emulsificação, assim como a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos. Estabelecem ligações a metais pesados, possuem actividade antimicrobiana e regulam a capacidade de adesão de microrganismos a superfícies. Apresentam baixa toxicidade, assim como a possibilidade de serem degradados por outros organismos (Krieger *et al*, 2007). Estes compostos mantêm-se ativos em condições extremas (Banat, 1995; Barros *et al*, 2008) sendo estáveis entre 30 e 45°C (Makkar *et al*, 1998) e pH entre 4,5 e 9 (Nitschke *et al*, 2007).

Uma das principais justificações para o crescente interesse nestes compostos relaciona-se com as suas propriedades tenso-activas, que apresentam elevado potencial para aplicação em áreas tão diversas como as indústrias de produtos cosméticos, na indústria farmacêutica como antibióticos e antifúngicos (Arima *et al*, 1968, Peypoux *et al*, 1999), na indústria alimentar como aditivos alimentares (emulsionificadores), na agricultura como herbicidas e pesticidas, na enzimologia aplicada, e ainda no processo de fabrico de tintas, têxteis e detergentes, entre outros produtos (Rosenberg *et al*, 1999, Nitschke *et al*, 2002)

Na indústria de tintas, é aplicado o biodispersan como agente dispersante e de melhoramento das propriedades da tinta (Rosenberg *et al*, 1999).

A surfactina, apresenta atividade antitumoral, anti-bacteriana e antiviral, e tem ainda a capacidade de induzir a formação de canais iónicos e inibir a formação de coágulos, sendo por isso um biossurfactante de ampla aplicação farmacêutica (Arima *et al*, 1968, Peypoux *et al*, 1999). Na mesma área de aplicação destaca-se também o lipopeptídeo iturina produzido por *Bacillus subtilis*, que tem a capacidade de alterar a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (Thimon *et al*, 1995). Os ramnolípidos apresentam propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* e

Enterococcus faecalis, entre outras bactérias potencialmente patogénicas (Benicasa *et al*, 2004).

Na indústria alimentar os biossurfactantes com capacidade de emulsificação assumem um papel preponderante no processamento de matérias primas através da dispersão e solubilização de alguns componentes, e permitindo a obtenção de substâncias com uma maior consistência (Vater, 1986). São aplicados na indústria de processamento das carnes para a emulsificação de gorduras, e em panificação, como acondicionadores da farinha. O bioemulsificante de *Candida utilis* é aplicado na preparação de molhos para saladas, conferindo-lhes propriedades organoléticas interessantes (Shepherd *et al*, 1995, Nitschke *et al*, 2002).

Os biossurfactantes são também usados na agricultura, especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas (Lin *et al*, 1998). Estas soluções possuem como agentes ativos compostos hidrofóbicos, havendo assim, uma necessidade de adição de agentes emulsificantes para os dispersar em solução aquosas. Os surfactantes produzidos pelo género *Bacillus* são os mais frequentemente usados na formulação de pesticidas com constituintes imiscíveis (Nitschke *et al*, 2002). Adicionalmente, os ramnolipídios possuem potencial para estratégias de controlo biológico de pragas, tendo sido aplicados nas raízes de plantas para proteção contra fungos.

Os biossurfactantes apresentam elevado potencial em biorremediação, sendo aplicáveis à recuperação de locais contaminados com petróleo e no tratamento de resíduos oleosos (Nitschke *et al*, 2002).

Substratos não convencionais para o cultivo de bactérias produtoras de biossurfactantes

O sucesso da produção de biossurfactantes em grande escala passa pela redução dos custos com recurso a matérias primas pouco dispendiosas. Os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de uma enorme variedade de substratos, incluindo substratos de muito baixo custo, como resíduos agroindustriais e óleos vegetais bem como outros sub-produtos ricos em hidratos de carbono (Nitschke *et al*, 2002).

Um dos resíduos mais comumente utilizado, o resíduo industrial de mandioca, é bastante rico em nutrientes e pode servir para a produção eficiente de surfactina por *Bacillus subtilis* (Barros *et al*, 2008). Do processamento da batata resulta um resíduo industrial com um elevado teor em amido e proteínas no qual se conseguiu produzir biossurfactante com capacidade de reduzir a tensão superficial até 28,3 mN/m (Makkar *et al*, 2002, Nitschke *et al*, 2007). Para a produção de soforolípidos aplicaram-se substratos provenientes do processamento de carnes (Nitschke *et al*, 2007) e este biossurfactante, tal como surfactina e ramnolípidos foram também produzidos a partir de resíduos de soro de leite ricos em lactose e proteínas (Makkar *et al*, 2002, Nitschke *et al*, 2007).

Os óleos vegetais são uma fonte lipídica de carbono que representa um tipo promissor de substrato para a produção de biossurfactantes. Deste grupo constam o óleo de girassol, a partir do qual se conseguiu produzir um biossurfactante que reduziu a tensão superficial da água até 39,1 mN/m (Benincasa *et al*, 2002, Nitschke *et al*, 2007, Costa e Nitschke, 2010). O óleo de algodão contém ácidos orgânicos, como o ácido palmítico, e ácido linoleico, e foi usado com sucesso para a produção de surfactina (Barros *et al*, 2008). O óleo de café, resultante da borra, pode revelar-se um substrato com potencial para a produção de biossurfactantes (Kondamudi *et al*, 2008, Couto *et al*, 2009).

Além dos substratos anteriormente referidos, há já estudos dirigidos à utilização de resíduos de lagares de azeite (OOME, *Olive oil mill effluent*). Este efluente de cor escura contendo resíduos de azeitona solúveis em água e açúcares, permitiu obter um biossurfactante com capacidade de reduzir a tensão superficial até 30 mN/m (Makkar *et al*, 2002).

Água de lavagem de azeitona

As azeitonas são um fruto rico em gordura. As atividades associadas ao processamento de azeitona e à produção de azeite, geram resíduos ricos em gordura que podem ter interesse como substrato para o cultivo de microrganismos lipofílicos. A produção de azeitona é uma atividade de especial interesse nos países europeus

mediterrânicos. Portugal encontra-se na lista dos maiores produtores de azeitona, ocupando a quarta posição a nível Europeu (Malheiro, 2010). Em Portugal, as atividades associadas à produção e processamento de azeitona são economicamente importantes e de longa tradição (Malheiro, 2010).

A fração lipídica pode atingir 22% do peso da azeitona, dependendo da fase de maturação (Garrido-Fernández *et al*, 1997, Bianchi *et al*, 2003), sendo composta por ácidos gordos saturados (15%), maioritariamente sob a forma de triglicerídeos. Na sua composição estão ainda presentes ácidos gordos monoinsaturados, celulose (5,8%), hidratos de carbono (19%), proteínas e minerais numa quantidade muito menor (1,6% e 1,5%, respectivamente), são ainda encontrados resíduos de fenóis, glicosídeos, pectinas e ácidos orgânicos (Boskou *et al*, 2006).

As azeitonas, na forma de frutos frescos, não são comestíveis, uma vez que apresentam um sabor amargo característico. Assim, têm que ser sujeitas a um processamento físico-químico de forma a reduzir parcialmente a quantidade de compostos fenólicos, especialmente a oleuropeína, o principal responsável pelo amargor (Ryan *et al*, 1998, Gómez *et al*, 2006). O processamento do fruto pode ser feito segundo procedimentos bastante diversificados. No entanto, ocorre sempre difusão dos substratos contidos na polpa para a salmoura, sendo lixiviados pelas lavagens seguintes (Sánchez *et al*, 2000). A hidrólise alcalina provoca a perda de cerca de 53% dos compostos fenólicos, e os açúcares difundem-se através da película do fruto. A fração lipídica, apesar da sua baixa solubilidade em água, sofre também perdas durante o processamento (Rodis *et al*, 2002, Ben Othman *et al*, 2009). Estas perdas dão origem a um efluente rico em matéria orgânica, designado por águas russas em virtude da sua coloração escura (Kiritsakis *et al*, 2001, Ferreira *et al*, 2008). Neste efluente são encontradas as substâncias solubilizadas a partir de azeitonas e as contidas nas águas adicionadas para lavagens e processamento de azeitonas. Trata-se de um tipo de efluente líquido caracterizado pelo seu intenso odor e pela presença de óleos em emulsão (Greco *et al*, 2006).

A fração orgânica contida nas águas russas, apesar de minoritária (3,5 a 15% em massa), é bastante rica em nutrientes, contendo essencialmente lípidos, ácidos orgânicos (oxálico, fumárico, láctico, glicérico), açúcares (glucose e frutose), compostos azotados,

polifenóis, poliálcoois e taninos. Contém ainda minerais (carbonatos, fosfatos e nitratos) ainda que numa percentagem reduzida (0,2 a 2,0%) e quantidades residuais de vitaminas, hormonas e alguns aminoácidos.

Na fração sólida, são encontrados compostos fenólicos, que dificultam bastante a biodegradação deste tipo de efluente. Os compostos fenólicos representam cerca de 10% da fração sólida, com concentrações variáveis (0,5 e 24 g L⁻¹) em função do tipo de processamento da azeitona. Adicionalmente, o elevado teor em ácidos gordos de cadeia longa, pode tornar as águas russas num problema ambiental, uma vez que apresentam atividade bioestática e fitotóxica (Morillo *et al*, 2007).

Objectivos

O objetivo do presente trabalho foi estudar a possibilidade de usar água de lavagem de azeitona como meio-base para o cultivo de bactérias produtoras de biossurfactantes. Como objetivos específicos colocou-se (1) a avaliação da adição de nutrientes à água de lavagem no sucesso do crescimento e na produção de biossurfactante; (2) a avaliação do crescimento e da produção de biossurfactante em diferentes valores de salinidade do meio e (3) a avaliação da atividade enzimática extracelular, nomeadamente lipolítica, dos isolados estudados (*Pseudomonas sp.* e *Pseudomonas putida*).

Material e Métodos

Material e Métodos

Microrganismos

Neste estudo foram usadas quatro estirpes do género *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes isoladas da Ria de Aveiro, a partir de culturas seletivas contendo diesel como única fonte de carbono (Domingues *et al*, in press). A matriz ambiental a partir da qual foram isoladas, bem como a sua identificação, são apresentadas na tabela 2.

As culturas encontravam-se armazenadas em glicerol a -80 °C em microtubos de 2 mL. Foram descongeladas à temperatura ambiente, transferindo-se de seguida 100 µl de inóculo para 10 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB, Merck).

Tabela 2- Identificação e origem das estirpes de *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes usadas neste estudo.

| Isolado # | Proveniência | Identificação |
|-----------|---|---------------------------|
| 5 | SML (microcamada superficial marinha) | <i>Pseudomonas putida</i> |
| 7 | SML (microcamada superficial marinha) | <i>Pseudomonas sp</i> |
| 27 | SML (microcamada superficial marinha) | <i>Pseudomonas sp</i> |
| 74 | Rizosfera de <i>Halimione portulacoides</i> | <i>Pseudomonas sp</i> |

Avaliação da atividade enzimática extracelular

Para avaliação do potencial hidrolítico das estirpes de *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes usadas neste estudo determinou-se fluorometricamente (espectrofluorímetro Jasco FP-777) a atividade das enzimas β -glucosidade, β -galactosidase, fosfatase, lipase, esterase e aminopeptidase, a partir da taxa de hidrólise máxima dos substratos modelo 4-metilumbeliferil- β -glucose (β -glucosidade), 4-metilumbeliferil- β -D-galactose (β -galactosidase), 4-metilumbeliferil-fosfato (fosfatase), 4-metilumbeliferil-acetato (esterase), 4-metilumbeliferil-estearato (lipase) e L-leucina-7-

amino-4-metil-coumarina (leucina-aminopeptidase) (Hoppe, 1993). A concentração de saturação utilizada para os substratos MUF- β -glucose, MUF-fosfato e MUF-acetato foi de 10 mM, para o MUF- β -galactose foi de 4 mM, para MUF-estearato foi de 1 mM e para leucina-MCA de 20 mM. A concentração de saturação dos substratos nas condições do ensaio foi determinada previamente por análise cinética.

Para cada isolado, preparou-se uma cultura fresca em Tryptic soy broth (TSB) de densidade óptica (D.O.₆₀₀) aproximadamente 0,8 e diluiu-se 1:1000 em tampão fosfato salino (PBS) de modo a obter uma suspensão com aproximadamente 10^5 cel mL⁻¹. Para determinação da hidrólise extracelular dos substratos modelo, distribuíram-se alíquotas de 1 mL de suspensão por séries de 3 (Leu-MCA) ou 6 (substratos-MUF) cuvettes semi-micro descartáveis (VWR). A cada alíquota adicionou-se o volume de solução-stock de substrato necessária para obter a concentração de saturação e procedeu-se à leitura de fluorescência inicial. No caso dos substratos MUF adicionou-se 100 μ L de uma solução tampão (1,384 mL de amônio, glicina e 0,375 g água destilada em 100 mL, pH 10,5) a cada cubete, antes da leitura, para intensificar a fluorescência. Após a leitura, a série inicial foi rejeitada, dado que a alcalinização condiciona a atividade bacteriana, e a incubação prosseguiu apenas na série de 3 cubetes reservadas para a leitura final. O tampão só foi adicionado no momento da leitura, na série de cubetes reservadas. No caso do substrato MCA, a leitura de fluorescência foi realizada diretamente na série de amostras que foi posteriormente sujeita a incubação até à leitura final. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 3 ou 4h para os substratos MUF e de 2h para L-leucina-7-amino-4-metil-coumarina. A intensidade de fluorescência foi lida nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 440, para MCA (metilcoumarona), e de 365 e 450, para MUF (metilumbeliferona).

Para cada radical fluorescente, construiu-se uma reta de calibração, adicionando diferentes volumes de uma solução padrão de MCA ou MUF a uma suspensão de células idêntica à usada nos ensaios. Com base na reta de calibração, procedeu-se à conversão das unidades de fluorescência em unidades de concentração do substrato. Os resultados foram corrigidos para o tempo de incubação e apresentados em concentração de substrato hidrolisado por hora.

Efeito da salinidade na produção de biossurfactantes

Para testar o efeito da salinidade na produção dos biossurfactantes os isolados foram cultivados em meio TSB, preparado de acordo com as instruções do fabricante, mas diluído 1:2 com água destilada. O pH foi devidamente ajustado a $7,3 \pm 0,2$, distribuindo-se de seguida em frascos de 10 mL. Aos diferentes frascos de meio, adicionou-se um volume adequado de uma solução concentrada de NaCl de forma a obter uma gama de concentrações entre 0 g L^{-1} e 30 g L^{-1} . Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C durante 20 min e conservados no frio até à sua utilização.

A partir de uma cultura fresca em TSB de cada isolado procedeu-se à inoculação dos meios correspondentes à gama de salinidades (0 a 30 g L^{-1}). As culturas foram incubadas a 37°C , com agitação a 180 rpm (OPTIC IVYMEN SYSTEM), durante 24 h.

Para a quantificação de biossurfactante, no final da incubação, procedeu-se à remoção das células do meio de cultura, por centrifugação de 75 mL a 8,000 rotações por minuto (rpm), durante 15 min. a 4°C (centrifuga Avanti™ J-25 I). O sobrenadante foi recolhido num tubo estéril e armazenado no frio a 4°C , para análise de biossurfactantes.

Para determinação da concentração de biossurfactante (ramnolípidos) produzido, foi utilizado um método direto de quantificação de ramnose. A quantificação de ramnolípidos foi feita pelo método do orcinol (Bondarenko *et al*, 2010). O reagente de orcinol foi preparado por dissolução de orcinol (3-5 dihidroxitolueno) (Sigma) a 0,19% numa solução de ácido sulfúrico (97%) (Merck) e perfazendo o restante volume com água destilada de modo a obter a concentração desejada de 53% (v/v).

Para construção da reta de calibração foram preparadas soluções-padrão de L-ramnose (Sigma) de concentrações entre 0 e 5 mg L^{-1} , a pH 8 em tampão de fosfato (obtido através da dissolução em 450 mL de água destilada de 4g de NaCl, 0,1g de KCl, 0,72g de Na_2HPO_4 e 0,12g de KH_2PO_4 , ajustar o pH e perfazer até 500 ml). Preparou-se também um branco constituído por solução tampão de fosfato.

A 100 µl de amostra, padrão ou branco, adicionaram-se 900 µl de reagente de orcinol. A mistura foi incubada a 80 °C durante 30 m, de forma a potenciar a reação de ramnose com o orcinol. De seguida, foram arrefecidas no escuro durante aproximadamente 35 minutos, até atingirem a temperatura ambiente. A densidade ótica a 421 nm foi medida num espectrofotómetro (Halo DB-20 – Dynamica).

Avaliação do crescimento e produção de ramnolípidos em meios formulados a partir de água de lavagem de azeitona

Colheita e caracterização da água de lavagem de azeitona

Como substrato para a preparação do meio de cultura usou-se água de lavagem de azeitonas, gentilmente cedida pela empresa Maçarico (Praia de Mira, Portugal). A recolha foi efetuada nas instalações da empresa, por imersão de frascos de vidro esterilizados no tanque de recolha das águas de lavagem de azeitona. A água foi transportada para o laboratório onde se procedeu à determinação da salinidade com um refratómetro e do pH com um potenciómetro. Procedeu-se ainda a uma filtração por vácuo com membrana de 7µm de porosidade (Whatman) de forma a remover detritos em suspensão. A água foi armazenada a 4 °C até à sua utilização na preparação dos meios de cultura.

A caracterização química foi efetuada no QOPNA-Departamento de Química da Universidade de Aveiro. As amostras foram centrifugadas a 10,000g durante 5 min. à temperatura ambiente, de modo remover a fracção particulada. O sobrenadante foi transferido para uma ampola de decantação, à qual se adicionou hexano, numa proporção de 1:1. Obteve-se uma mistura com duas fases distintas: a fase inferior (aquosa) foi usada para determinação do teor de açúcares e proteínas solúveis e a fase superior (orgânica) foi usada para análise de lípidos.

A quantificação de açúcares totais foi efetuada segundo o método colorimétrico de Dubois *et al*, 1956 usando glucose como padrão. Para quantificação do teor de proteína solúvel aplicou-se o método do biureto (Wilson *et al*, 2000), usando albumina sérica bovina como padrão. Para determinação do teor lipídico, aplicou-se um método

adaptado de Warren et al 1988, colocou-se a fase orgânica do extrato inicial num evaporador rotativo de forma a remover o solvente, o resíduo sólido remanescente apresentado na forma de pó foi assim recolhido e pesado.

Preparação dos meios de cultura

Usando como base a água de lavagem de azeitona (ALA), foram preparados meios de cultura representativos de várias condições de disponibilidade nutricional de carbono orgânico, azoto e fósforo. Para tal, procedeu-se à mistura de ALA e água destilada nas proporções de 1:2 e de 1:4 e à adição de fontes de carbono orgânico (extrato de levedura), azoto (NH_4Cl) e/ou fósforo (K_2HPO_4) de acordo com as combinações apresentadas na tabela 3.

No meio contendo ALA 1:4, adicionou-se NaCl de modo a corrigir a salinidade para o mesmo valor que o meio contendo $\frac{1}{2}$ de ALA ($0,8 \text{ g L}^{-1}$). O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,5$ e os meios de cultura foram autoclavados a 121°C durante 20 min e conservados no frio até à sua utilização.

Tabela 3- Formulação dos meios de cultura representando várias condições de disponibilidade nutricional.
ALA - água de lavagem de azeitona.

| Meio # | Meio | ALA (mL) | dH ₂ O (mL) | Extrato de levedura (0,1%) | NH ₄ Cl (100mM) | K ₂ HPO ₄ (10Mm) | Na Cl (0,04gL ⁻¹) |
|--------|---------------------------------|----------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--|-------------------------------|
| 1 | $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N +P | 50 | 50 | X | X | X | |
| 2 | $\frac{1}{2}$ de ALA + C +N | 50 | 50 | X | X | | |
| 3 | $\frac{1}{2}$ de ALA + C +P | 50 | 50 | X | | X | |
| 4 | $\frac{1}{2}$ de ALA + C | 50 | 50 | X | | | |
| 5 | $\frac{1}{2}$ de ALA + N +P | 50 | 50 | | X | X | |
| 6 | $\frac{1}{2}$ de ALA + N | 50 | 50 | | X | | |
| 7 | $\frac{1}{2}$ de ALA + P | 50 | 50 | | | X | |
| 8 | $\frac{1}{2}$ de ALA | 50 | 50 | | | | |
| 9 | $\frac{1}{4}$ de ALA + C +N + P | 25 | 75 | X | X | X | X |
| 10 | $\frac{1}{4}$ de ALA +C +N | 25 | 75 | X | X | | X |
| 11 | $\frac{1}{4}$ de ALA +C +P | 25 | 75 | X | | X | X |
| 12 | $\frac{1}{4}$ de ALA +C | 25 | 75 | X | | | X |
| 13 | $\frac{1}{4}$ de ALA +N + P | 25 | 75 | | X | X | X |
| 14 | $\frac{1}{4}$ de ALA +N | 25 | 75 | | X | | X |
| 15 | $\frac{1}{4}$ de ALA +P | 25 | 75 | | | X | X |
| 16 | $\frac{1}{4}$ de ALA | 25 | 75 | | | | X |

Curvas de crescimento

Para avaliação do crescimento, construiu-se curvas de crescimento dos diferentes isolados. Cada um dos isolados foi cultivado *overnight* a 37 °C, com agitação, em meio TSB até D.O.₆₀₀ de 0,8. A cultura assim obtida foi usada para a inoculação de cada um dos meios apresentados na tabela 3 e identificados com os números 1 a 16. Os meios inoculados foram colocados sobre agitação a 37 °C num incubador orbital (OPTIC IVYMEN SYSTEM). Para a avaliação do crescimento, procedeu-se à determinação da D.O.₆₀₀ em alíquotas recolhidas regularmente a cada duas horas, durante a fase lag e a cada hora na fase exponencial, até se atingir a fase estacionária, usando meio não inoculado como branco. A taxa específica de crescimento foi calculada pela variação dos valores de D.O.₆₀₀ durante a fase exponencial.

Quantificação de biossurfactante

Para além do método direto referido anteriormente, fez-se também a quantificação de biossurfactante produzido nos vários meios de cultura pelo método indireto de redução da tensão superficial, seguindo uma adaptação da técnica do colapso da gota de Bodour e Miller-Maier, 1998, de forma a obter uma análise quantitativa. Para construção da reta de calibração foram usadas soluções-padrão do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS-Bio-Rad). Para tal, procedeu-se à centrifugação das culturas e remoção das células de modo análogo ao descrito para a quantificação de ramnolípidos. Para o teste do colapso da gota, colocou-se uma gota de 2.0 µL de parafina (Merck) sobre uma lâmina de vidro previamente lavada com água quente, etanol a 96% e água destilada e reservou-se durante 2-3h, para estabilização. Com uma micropipeta alinhada num ângulo de 45° relativamente à superfície da lâmina, colocou-se no centro da gota de parafina 5 µL de amostra ou solução-padrão de surfactante. Deixou-se repousar cerca de 1min. e observou-se numa lupa (Olympus SZX9- LabControle) equipada com micrómetro, registando o diâmetro final da gota. Todas as determinações foram feitas em triplicado, sendo o valor calculado pela média de três réplicas.

Análise estatística

Procedeu-se à análise paramétrica das variâncias (ANOVA) com o objectivo de comparar a produção de biossurfactante dos diferentes isolados e de avaliar o efeito de factores como a salinidade e a adição de suplementos ao meio de cultura. O programa de análise estatística utilizado foi o SPSS 15.0.

Resultados

Resultados

Atividade enzimática extracelular

Os valores das taxas máximas de hidrólise estimadas para as seis enzimas estudadas são apresentados na tabela 4. Não foi possível determinar a taxa máxima de atividade da β -glucosidase no isolado 7, por dificuldades experimentais.

Tabela 4- Taxa máxima de atividade de seis enzimas extracelulares avaliada em suspensões dos isolados 5, 7, 27 e 74 com recurso a substratos modelo fluorogénicos. Valores médios de 3 réplicas analíticas \pm desvio padrão.

| Enzima | Taxa de hidrólise enzimática (nmol/L.h) | | | |
|------------------------|---|--------------------|---------------------|---------------------|
| | Isolado 5 | Isolado 7 | Isolado 27 | Isolado 74 |
| β -glucosidase | 10,565 \pm 0,348 | - | 3,439 \pm 0,154 | 23,905 \pm 1,170 |
| β -galactosidase | 14,136 \pm 2,700 | 19,000 \pm 2,165 | 2,442 \pm 0,099 | 18,195 \pm 0,139 |
| fosfatase | 5,598 \pm 0,974 | 4,480 \pm 0,709 | 6,705 \pm 1,569 | 11,464 \pm 0,286 |
| lipase | 11,886 \pm 0,206 | 2,204 \pm 0,443 | 2,396 \pm 0,238 | 37,227 \pm 2,276 |
| esterase | 75,731 \pm 6,325 | 60,504 \pm 6,632 | 107,675 \pm 7,552 | 111,347 \pm 1,593 |
| aminopeptidase | 72,125 \pm 1,026 | 18,077 \pm 1,231 | 25,404 \pm 0,513 | 64,109 \pm 11,235 |

O isolado 74 apresenta os maiores valores de taxa máxima de atividade das enzimas, com a exceção da β -galactosidase que foi registada no isolado 7 e da aminopeptidase no isolado 5. As taxas mais baixas de atividade das enzimas relacionadas com a hidrólise de polissacáridos (β -glucosidase e β -galactosidase) registam-se no isolado 27. As restantes atividades foram mais baixas no isolado 7. A análise estatística demonstrou que os isolados possuem preferência pelo tipo de substrato que utilizam, uma vez que a hidrólise enzimática foi significativamente maior nas enzimas esterase e aminopeptidase (ANOVA II, $p < 0.05$).

Efeito da salinidade na produção de biossurfactante

A produção de ramnolípido registada em meios com diferente salinidade está representada figura 5. A concentração de ramnolípido nos diferentes meios de cultura

variou entre 1,47 e 4,64 mg L⁻¹ (isolado 27 em 30 e 0g L⁻¹ de salinidade, respetivamente) sendo ligeiramente mais baixa no isolado 5, nos meios de salinidade 0, 5 10 e 20 g L⁻¹. O aumento da salinidade do meio correspondeu a uma menor produção de ramnolípidos, sendo este efeito particularmente significativo (ANOVA II, p<0.05), destacando-se a partir da concentração de 20 g L⁻¹ para todos os isolados.

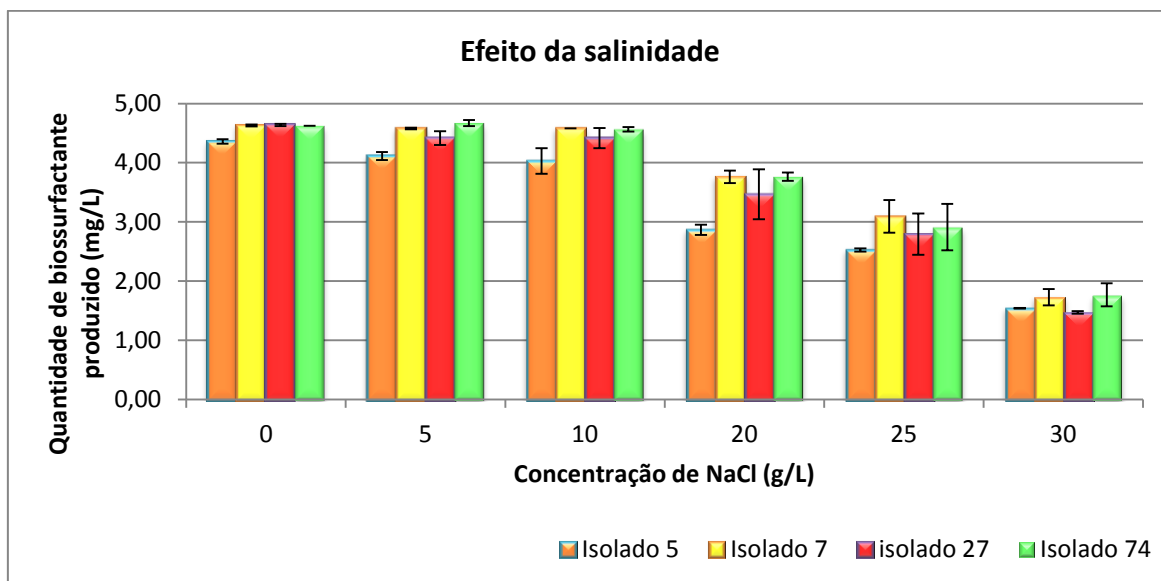


Figura 5- Produção de ramnolípidos em meio de cultura com concentrações de sal de 0 a 30 g L⁻¹. As colunas representam o valor médio de biossurfactante produzido de duas réplicas analíticas. As barras verticais representam o desvio padrão.

Caracterização química da água de lavagem de azeitona

Os resultados das análises efetuadas no QOPNA-Departamento de Química à água de lavagem de azeitona revelaram um conteúdo de 111, 058 µg mL⁻¹ de açúcares, 3,602 mg mL⁻¹ de proteínas e 0,455 mg mL⁻¹ de lípidos. A salinidade foi de 1,6 g L⁻¹ e o pH 8,3.

Crescimento em meios formulados a partir de água de lavagem de azeitona

O crescimento dos isolados 5, 7, 27 e 74 nos diferentes meios de cultura testados foi representado sob a forma de curvas de crescimento e caracterizado pelo valor da taxa específica de crescimento.

Isolado 5- *Pseudomonas putida*

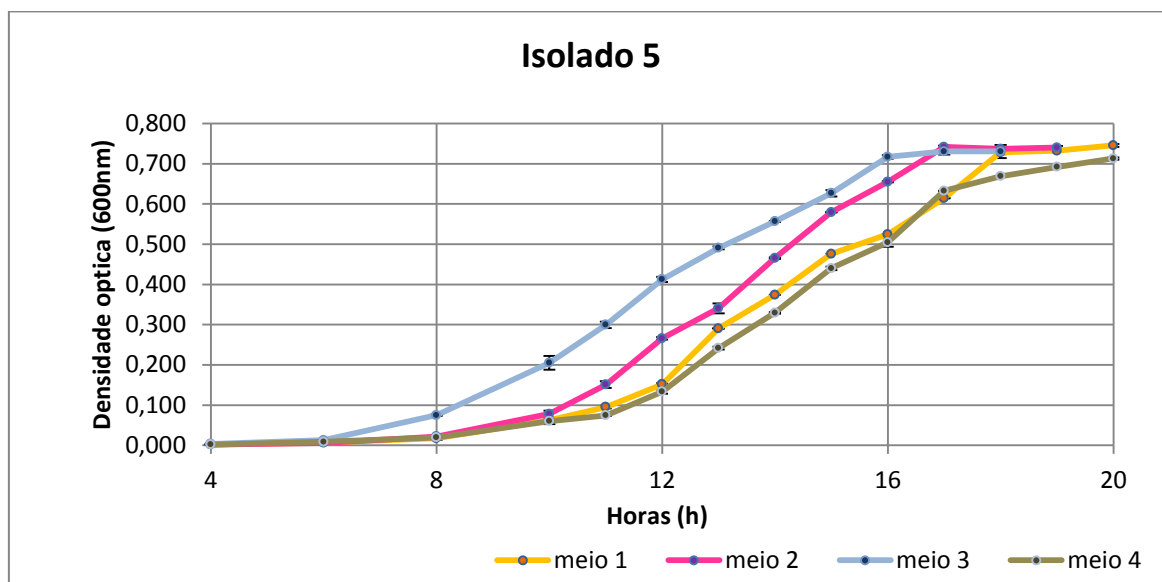


Figura 6 – Curvas de crescimento do isolado 5 (*Pseudomonas putida*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N +P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C +N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C +P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C.

As curvas de crescimento do isolado 5 cultivado em meios com adição de carbono orgânico são apresentadas nas figuras 6 ($\frac{1}{2}$ ALA) e 7 ($\frac{1}{4}$ ALA). O comportamento é bastante semelhante em ambas as figuras, indicando que a diluição do meio base (ALA) com água destilada não afetou significativamente o crescimento na condição de adição de suplementos. Os meios 3 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C +P) e 11 ($\frac{1}{4}$ de ALA +C +P) contendo fontes adicionais de carbono orgânico e fósforo produziram o melhor crescimento do isolado 5, seguindo-se os meios 2 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C +N) e 10 ($\frac{1}{4}$ de ALA +C +N) em que se adicionou suplementos de carbono orgânico e azoto.

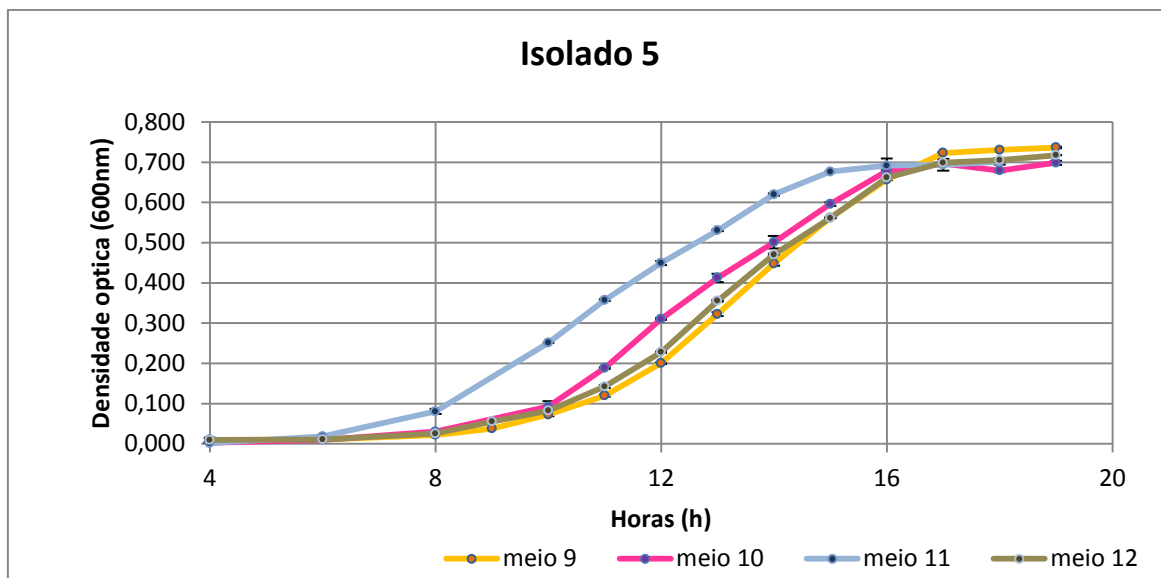


Figura 7 – Curvas de crescimento do isolado 5 (*Pseudomonas putida*) cultivado em meios contendo ¼ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 9- ¼ de ALA + C +N + P, 10- ¼ de ALA +C +N, 11- ¼ de ALA +C +P, 12- ¼ de ALA +C.

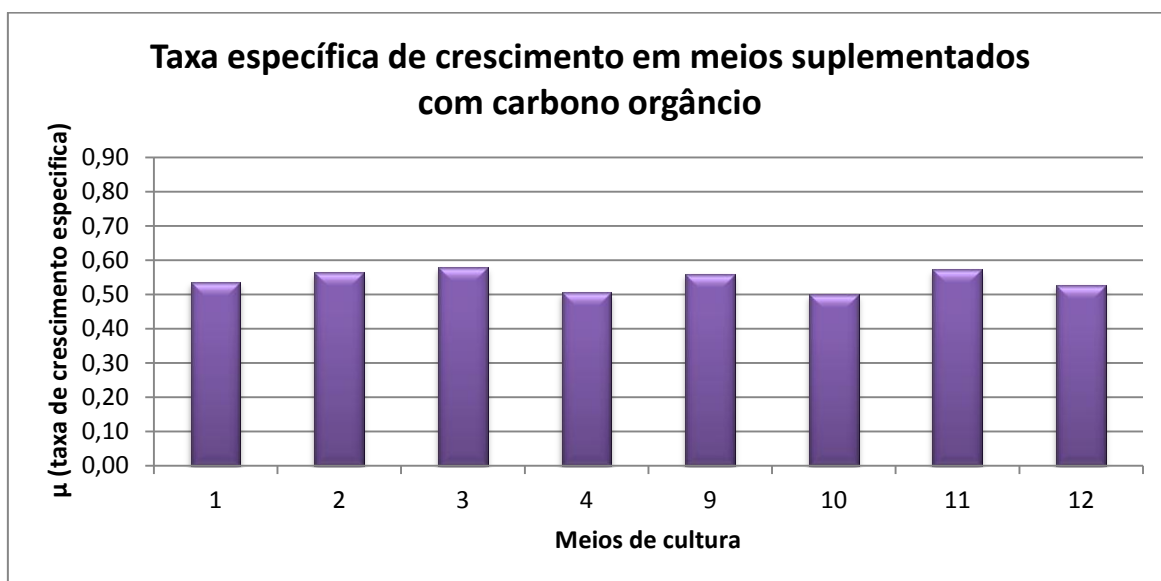


Figura 8- Taxa específica de crescimento do isolado 5 nos diferentes meios de cultura. Apenas estão representadas os valores calculados para os meios de cultura em que se observou crescimento (meios suplementados com extrato de levedura).

Legenda da constituição dos meios:1- ½ de ALA + C + N +P, 2- ½ de ALA + C +N, 3- ½ de ALA + C +P, 4- ½ de ALA + C, 9- ¼ de ALA + C +N + P, 10- ¼ de ALA +C +N, 11- ¼ de ALA +C +P, 12- ¼ de ALA +C.

Os valores da taxa específica de crescimento do isolado 5 nos meios em que ocorreu crescimento (meios suplementados com extrato de levedura) estão representados na figura 8. Embora relativamente constantes, os valores máximos correspondem aos meios 3 e 11, correspondentes a suplementos de carbono orgânico e fósforo.

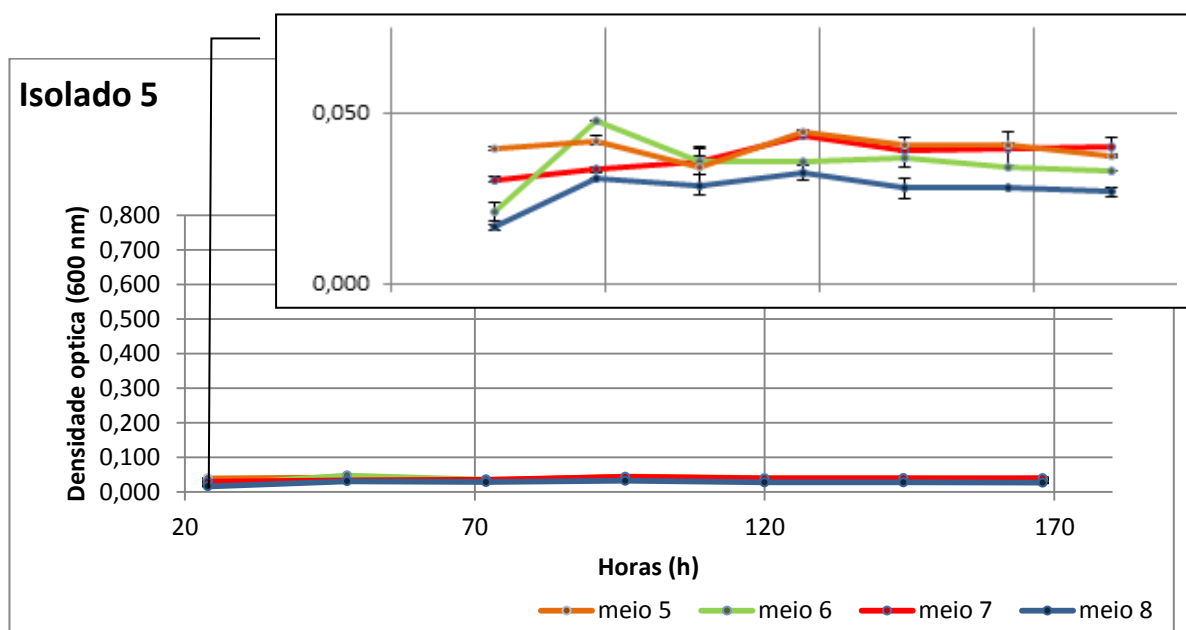


Figura 9 – Curvas de crescimento do isolado 5 (*Pseudomonas putida*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 5- $\frac{1}{2}$ de ALA + N +P, 6- $\frac{1}{2}$ de ALA + N, 7- $\frac{1}{2}$ de ALA + P, 8- $\frac{1}{2}$ de ALA.

Nos meios em que não houve adição de uma fonte de carbono orgânico (Figuras 9 e 10) não houve crescimento detetável durante a duração da experiência.

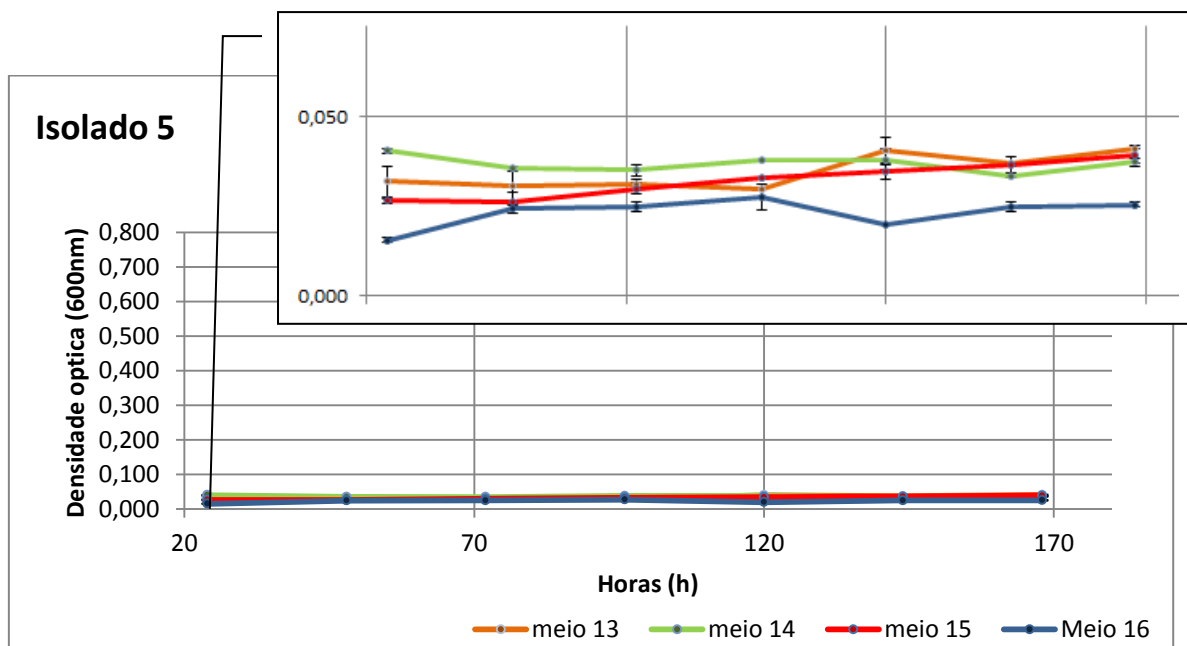


Figura 10 – Curvas de crescimento do isolado 5 (*Pseudomonas putida*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{4}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 13- $\frac{1}{4}$ de ALA + N + P, 14- $\frac{1}{4}$ de ALA + N, 15- $\frac{1}{4}$ de ALA + P, 16- $\frac{1}{4}$ de ALA.

Isolado 7- *Pseudomonas* sp.

As curvas de crescimento do isolado 7 em meios suplementados com carbono orgânico são apresentadas nas figuras 11 ($\frac{1}{2}$ ALA) e 12 ($\frac{1}{4}$ ALA). O crescimento foi mais acentuado nos meios 1 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C + N +P) e 9 ($\frac{1}{4}$ de ALA + C +N + P) contendo suplementos de carbono orgânico, azoto e fósforo, nos quais se registou os valores mais elevados para a taxa específica de crescimento (Figura 13). Os meios 3 ($3\frac{1}{2}$ de ALA + C +P) e 11 e ($\frac{1}{4}$ de ALA +C +P) combinando suplementos de carbono orgânico e fósforo, apresentaram também bom crescimento, com uma fase lag tendencialmente mais curta do que as restantes formulações. As taxas de crescimento em meio com ALA $\frac{1}{4}$ foram ligeiramente superiores às estimadas para os meios correspondentes com base em ALA $\frac{1}{2}$.

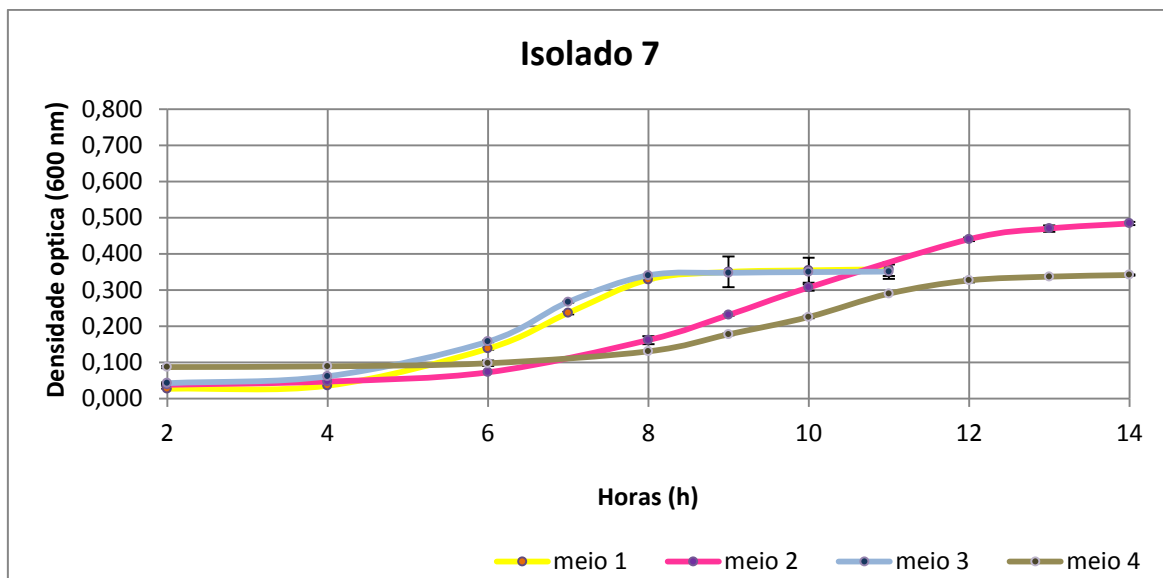


Figura 11 – Curvas de crescimento do isolado 7 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C.

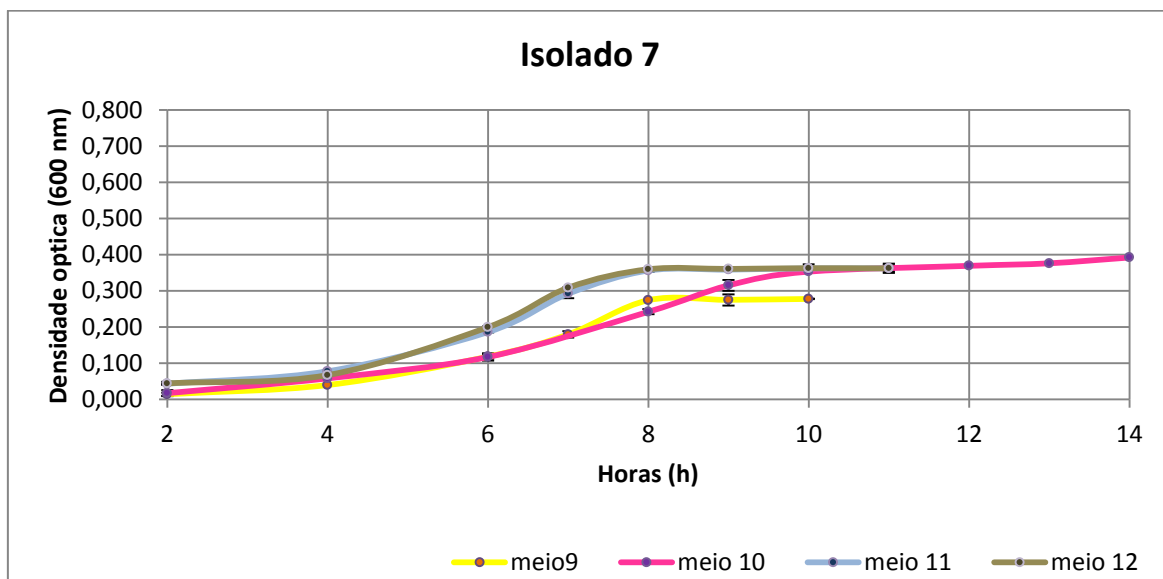


Figura 12 – Curvas de crescimento do isolado 7 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{4}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

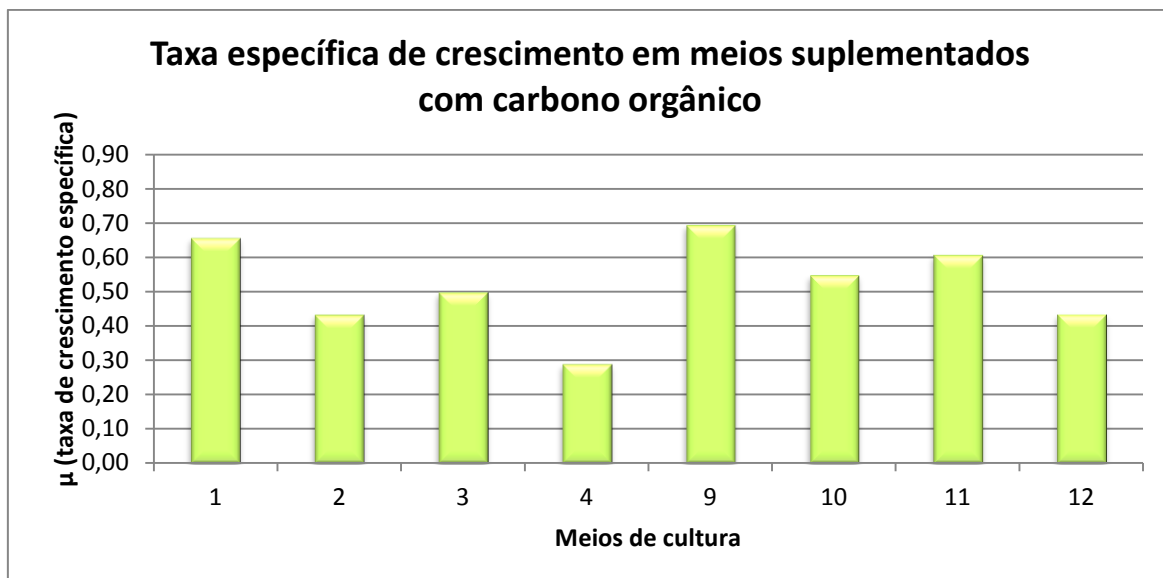


Figura 13- Taxa específica de crescimento do isolado 7 nos diferentes meios de cultura. Apenas estão representadas os valores calculados para os meios de cultura em que se observou crescimento (meios suplementados com extrato de levedura).

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C, 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

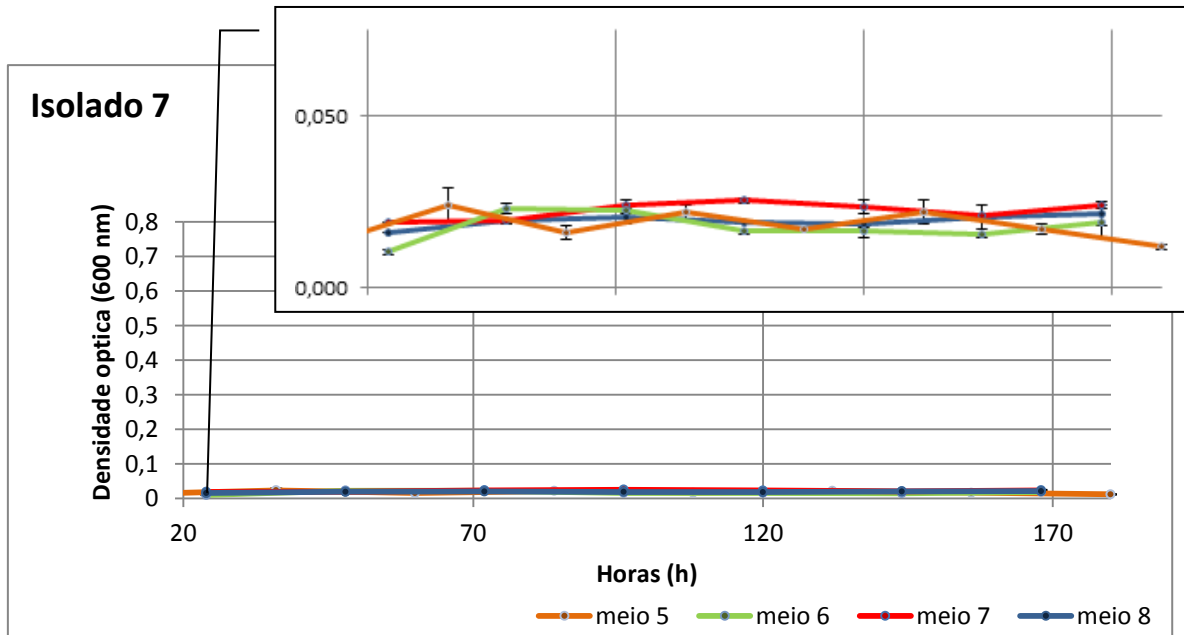


Figura 14 – Curvas de crescimento do isolado 7 (*Pseudomonas sp*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 5- $\frac{1}{2}$ de ALA + N + P, 6- $\frac{1}{2}$ de ALA + N, 7- $\frac{1}{2}$ de ALA + P, 8- $\frac{1}{2}$ de ALA.

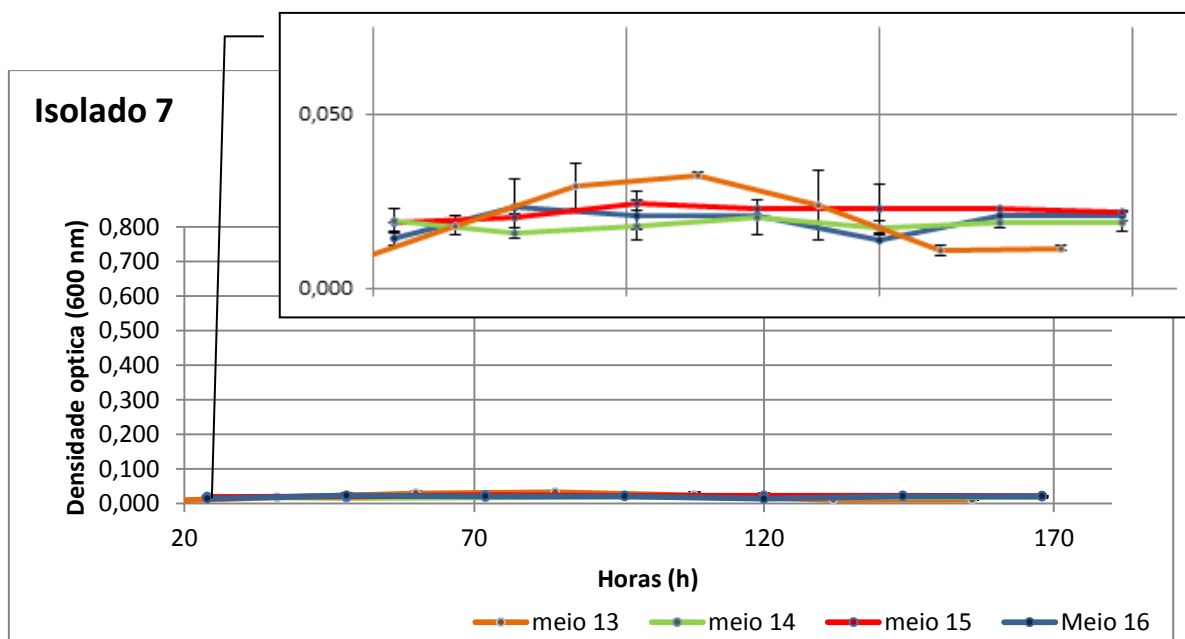


Figura 15 – Curvas de crescimento do isolado 7 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{4}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 13- $\frac{1}{4}$ de ALA + N + P, 14- $\frac{1}{4}$ de ALA + N, 15- $\frac{1}{4}$ de ALA + P, 16- $\frac{1}{4}$ de ALA.

Não houve crescimento significativo do isolado 7 nos meios não suplementados com extrato de levedura (Figuras 14 e 15).

Isolado 27- *Pseudomonas sp.*

As curvas de crescimento do isolado 27 em meios suplementados com carbono orgânico são apresentadas nas figuras 16 ($\frac{1}{2}$ ALA) e 17 ($\frac{1}{4}$ ALA). O crescimento foi mais acentuado no meio 1 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P) no qual a taxa de crescimento foi mais elevada (Figura 18). As restantes formulações (meios de 2 a 12) resultaram em curvas de crescimento com perfis bastante semelhantes. No entanto, nos meios 3 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C + P) e 11 ($\frac{1}{4}$ de ALA + C + P) contendo suplementos de carbono orgânico e fósforo mas não de azoto, a fase logarítmica iniciou-se mais tarde. No conjunto dos meios suplementados com carbono orgânico não se notou o efeito da diluição de ALA de $\frac{1}{2}$ para $\frac{1}{4}$.

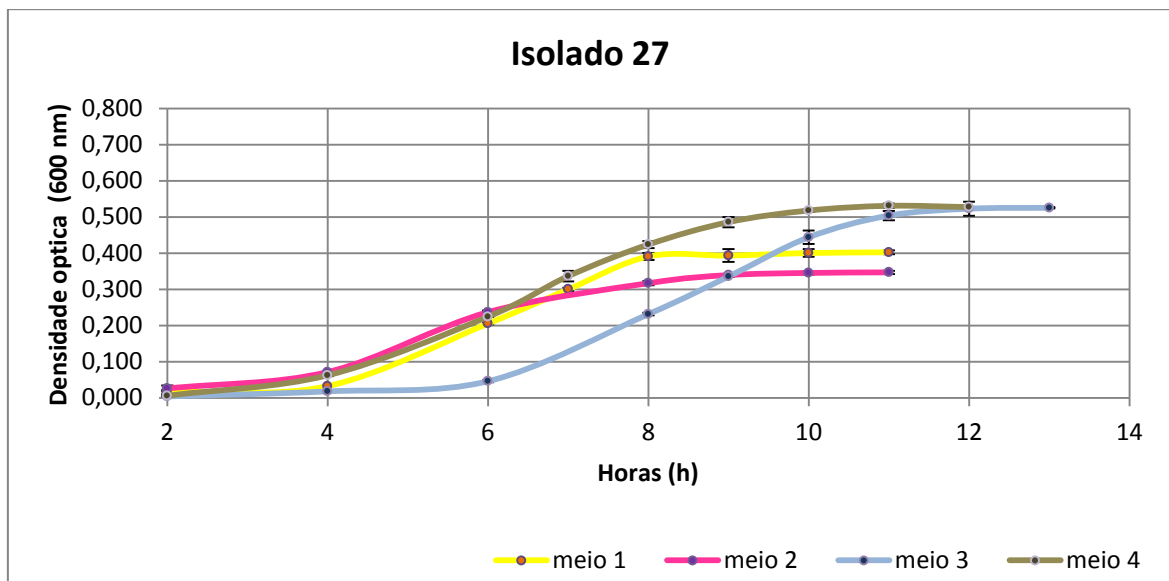


Figura 16 – Curvas de crescimento do isolado 27 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C.

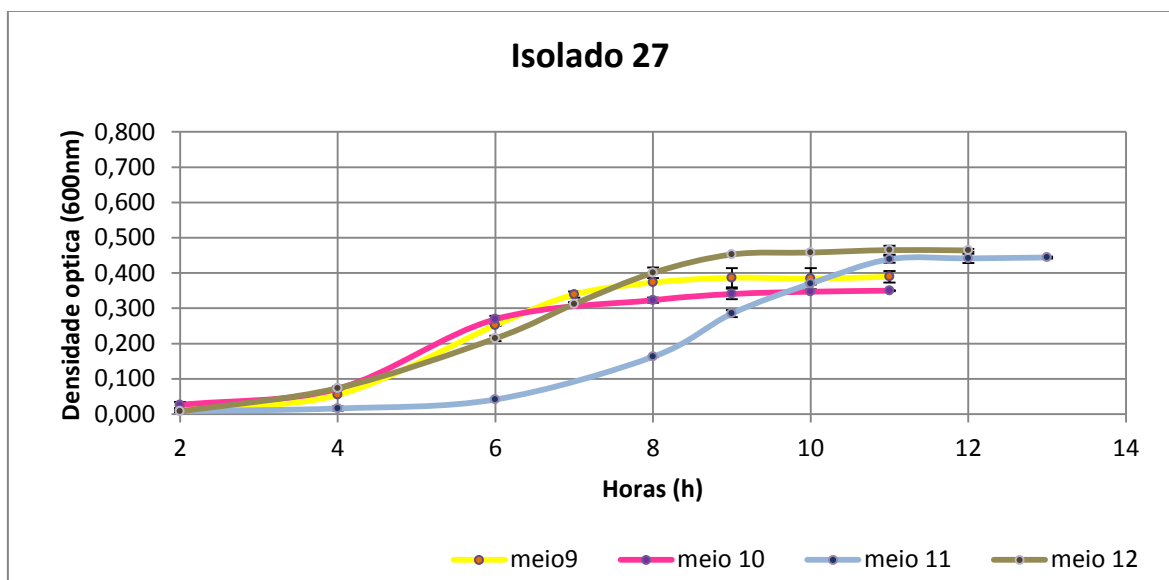


Figura 17 – Curvas de crescimento do isolado 27 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{4}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

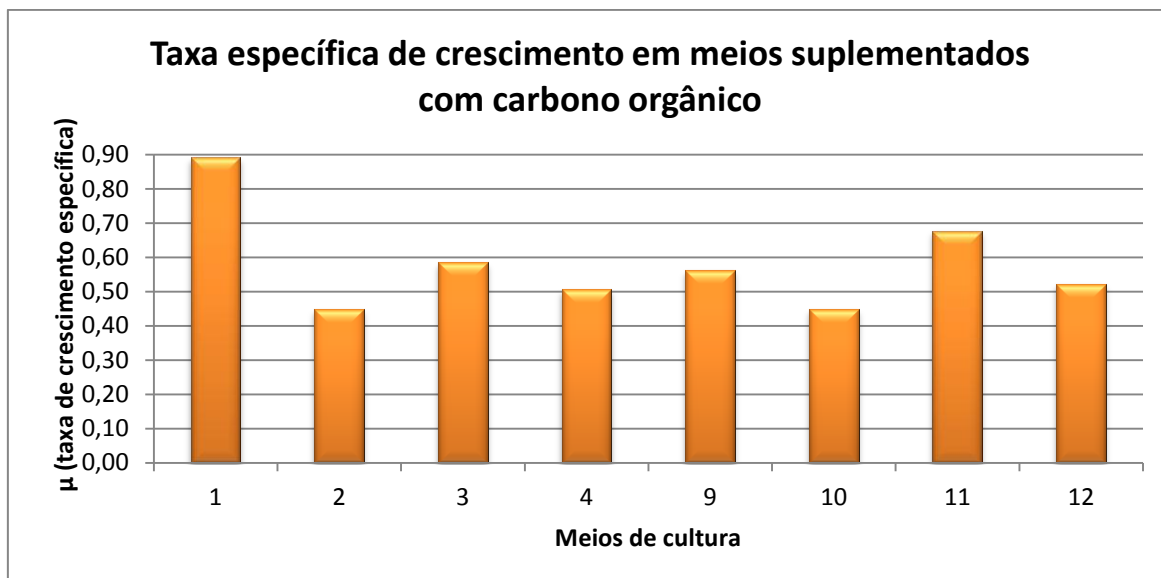


Figura 18- Taxa específica de crescimento do isolado 27 nos diferentes meios de cultura. Apenas estão representadas os valores calculados para os meios de cultura em que se observou crescimento (meios suplementados com extrato de levedura).

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C, 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

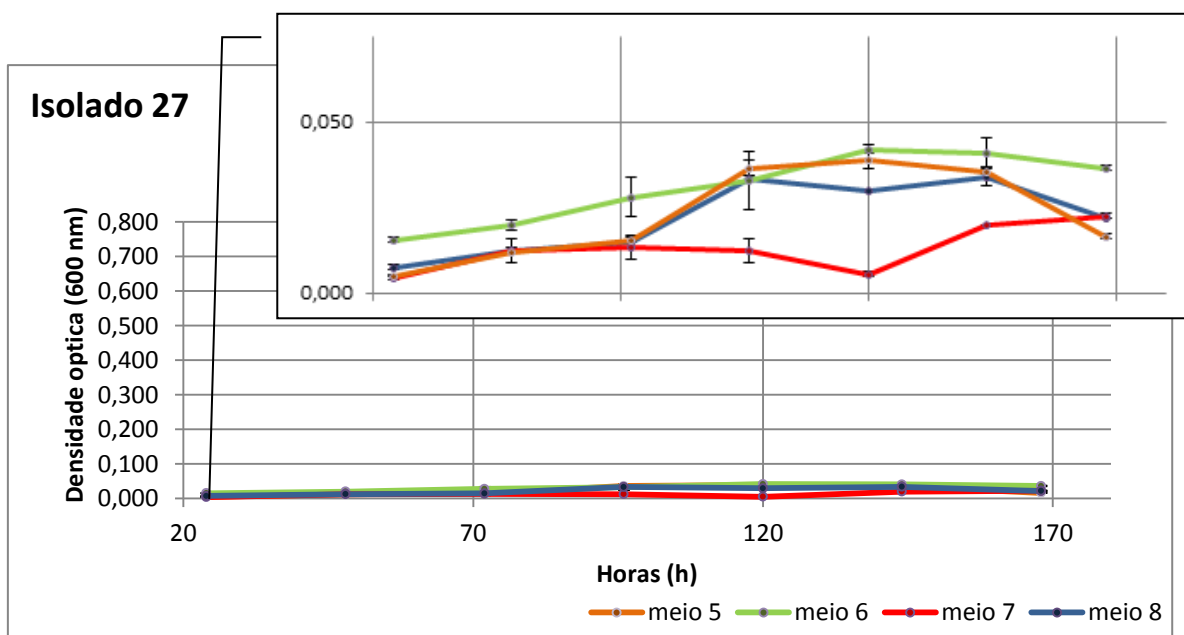


Figura 19 – Curvas de crescimento do isolado 27 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 5- $\frac{1}{2}$ de ALA + N + P, 6- $\frac{1}{2}$ de ALA + N, 7- $\frac{1}{2}$ de ALA + P, 8- $\frac{1}{2}$ de ALA.

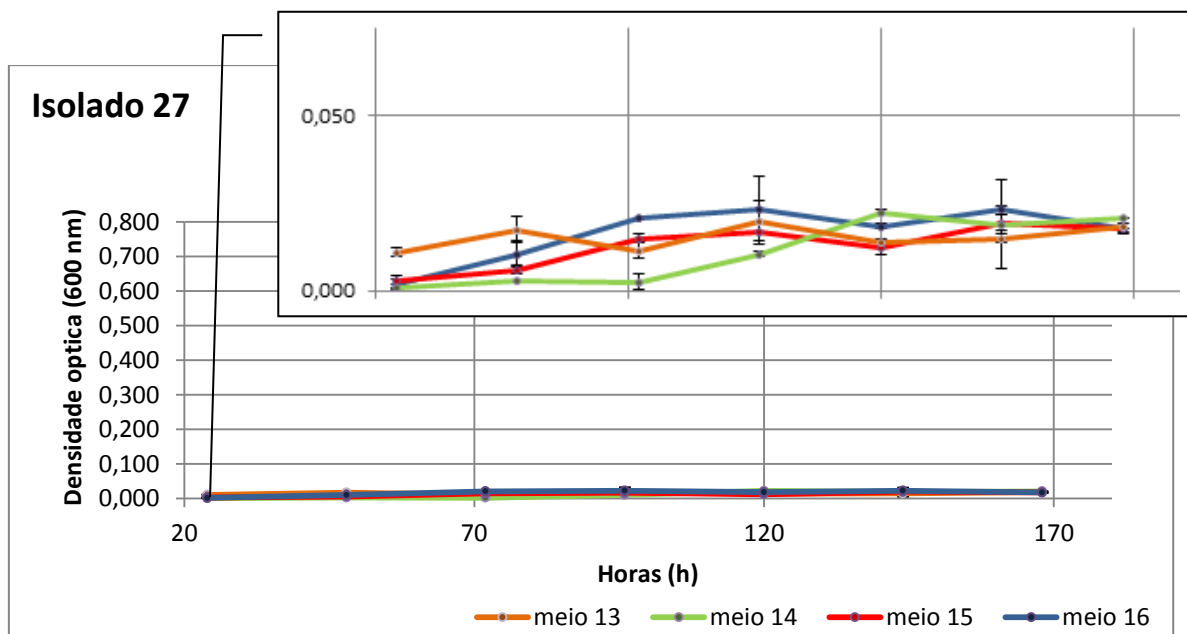


Figura 20 – Curvas de crescimento do isolado 27 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{4}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 13- $\frac{1}{4}$ de ALA + N + P, 14- $\frac{1}{4}$ de ALA + N, 15- $\frac{1}{4}$ de ALA + P, 16- $\frac{1}{4}$ de ALA.

Nos meios em que não se adicionou uma fonte suplementar de carbono orgânico, não houve crescimento da estirpe 27 como se pode verificar nas figuras 19 e 20.

Isolado 74- *Pseudomonas sp.*

As curvas de crescimento do isolado 74 em meios suplementados com carbono orgânico são apresentadas nas figuras 21 ($\frac{1}{2}$ ALA) e 22 ($\frac{1}{4}$ ALA). O crescimento foi mais acentuado no meio 1 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P) e no meio 4 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C) e 12 ($\frac{1}{4}$ de ALA + C), para os quais se registaram as maiores taxas de crescimento (Figura 23). Nos meios 1 ($\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P) e 9 ($\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P) a fase lag foi mais prolongada do que nas restantes formulações. No conjunto dos meios suplementados com carbono orgânico não se notou um efeito consistente da diluição de ALA de $\frac{1}{2}$ para $\frac{1}{4}$.

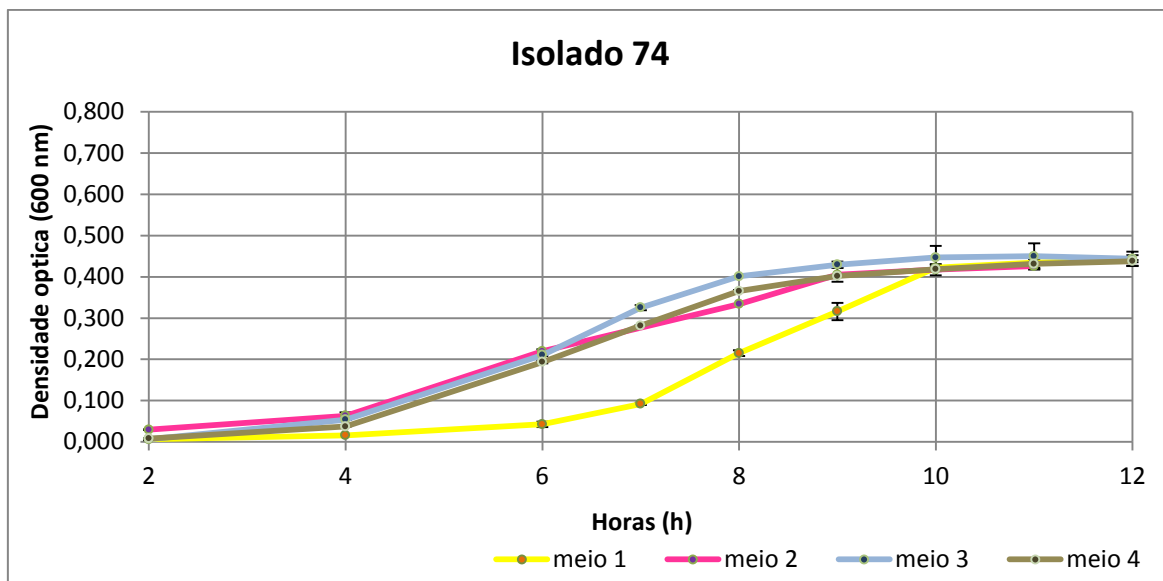


Figura 21 – Curvas de crescimento do isolado 74 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C.

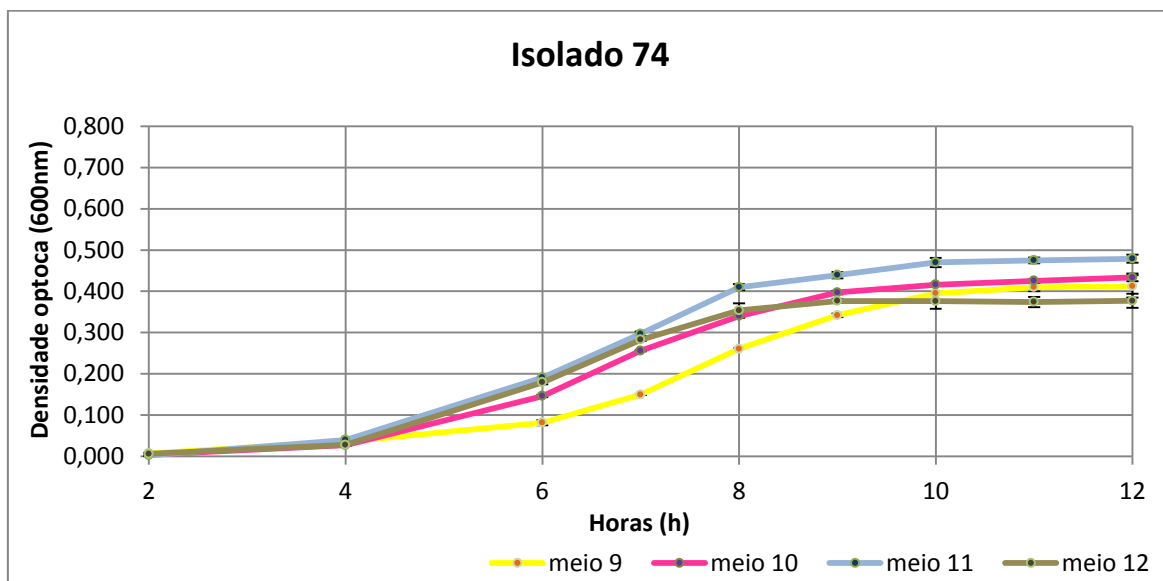


Figura 22 – Curvas de crescimento do isolado 74 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{4}$ de ALA com adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

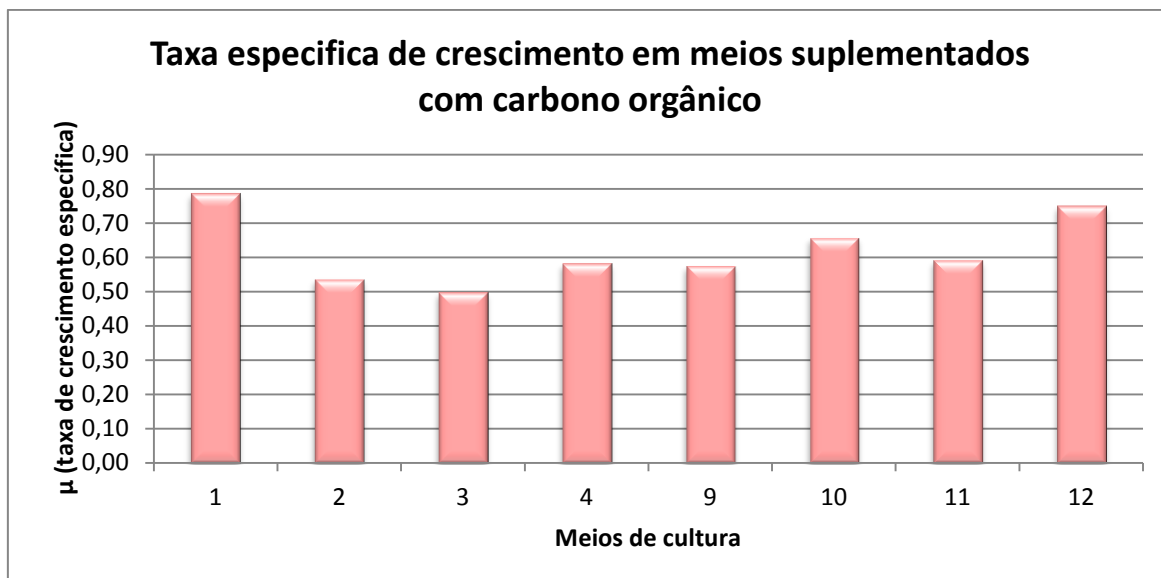


Figura 23- Taxa específica de crescimento do isolado 74 nos diferentes meios de cultura. Apenas estão representadas os valores calculados para os meios de cultura em que se observou crescimento (meios suplementados com extrato de levedura).

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C, 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

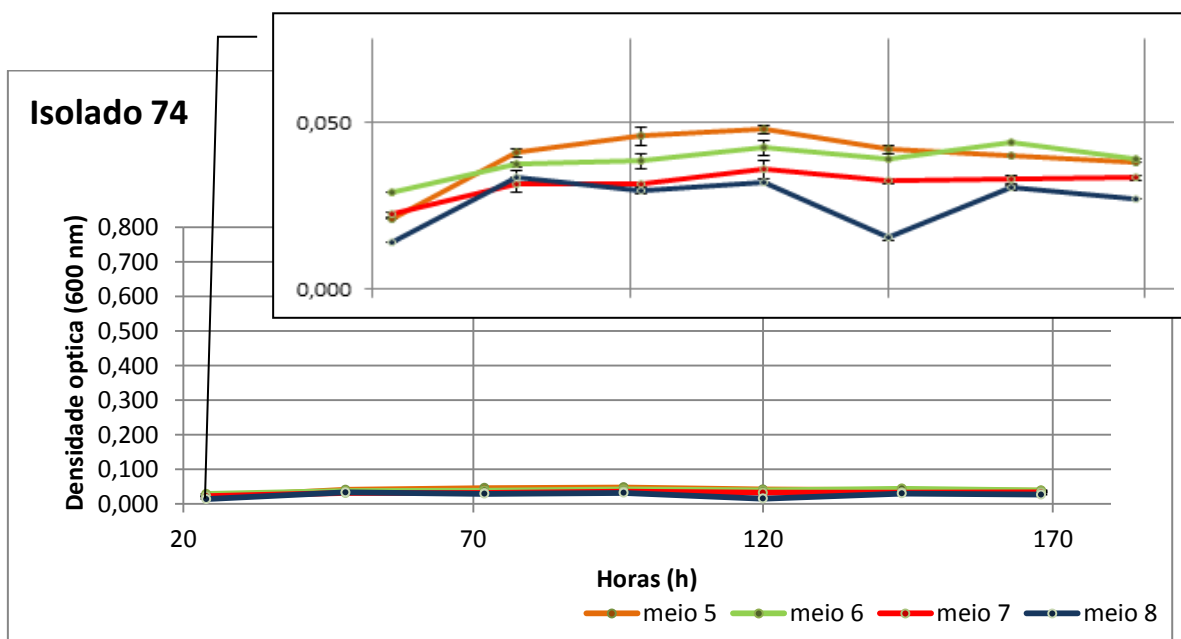


Figura 24 – Curvas de crescimento do isolado 74 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo $\frac{1}{2}$ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 5- $\frac{1}{2}$ de ALA + N + P, 6- $\frac{1}{2}$ de ALA + N, 7- $\frac{1}{2}$ de ALA + P, 8- $\frac{1}{2}$ de ALA.

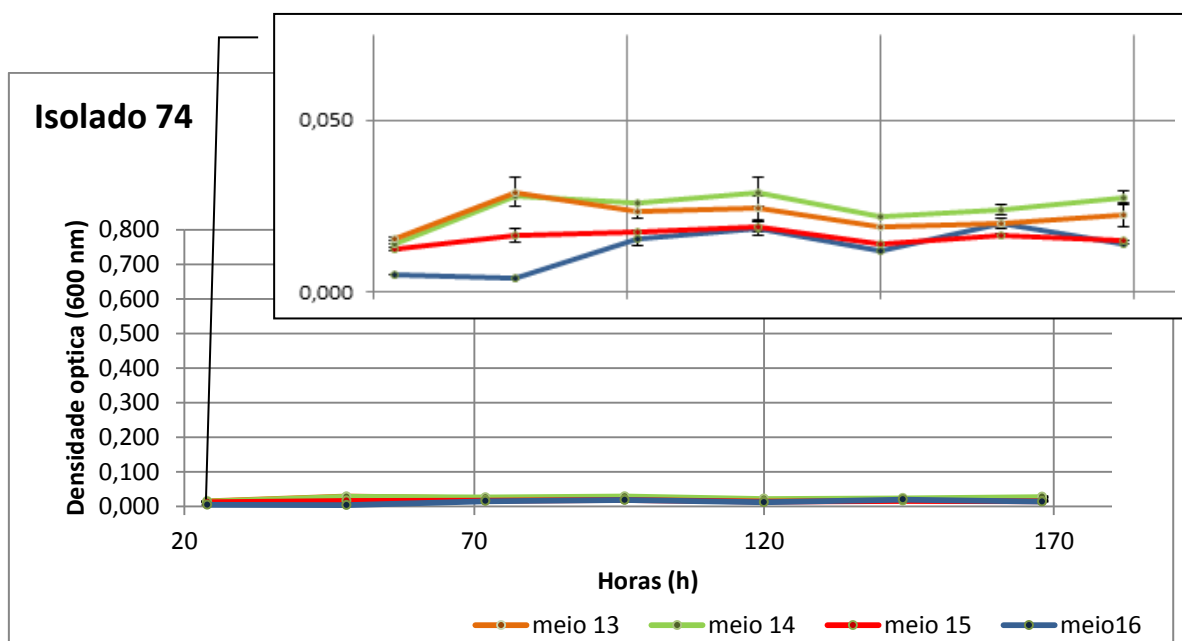


Figura 25 – Curvas de crescimento do isolado 74 (*Pseudomonas sp.*) cultivado em meios contendo ¼ de ALA sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de fonte de carbono.

Legenda da constituição dos meios: 13- ¼ de ALA + N + P, 14- ¼ de ALA + N, 15- ¼ de ALA + P, 16- ¼ de ALA.

Nos meios em que não se adicionou uma fonte suplementar de carbono orgânico, não houve crescimento o isolado 74 como se pode verificar nas figuras 24 e 25.

Para efeito comparativo, os valores da taxa específica de crescimento dos isolados 5, 7, 27 e 74 em cada um dos meios em que houve crescimento (meios suplementados com carbono orgânico) estão representados na figura 26. De um modo geral, os valores mais elevados foram registados no meio 1 (½ de ALA + C + N +P). O isolado 5 é o que apresenta a taxa de crescimento mais constante nos diferentes meios com um valor médio de $0,54 \pm 0,03$.

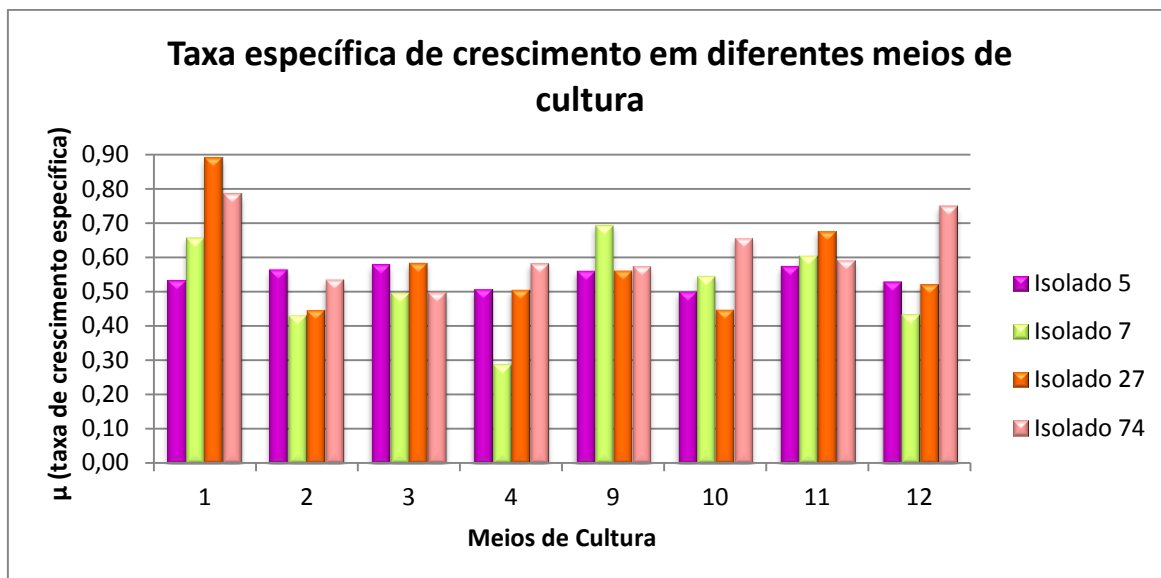


Figura 26- Comparação da taxa específica de crescimento dos diferentes meios de cultura com base nas curvas de crescimento dos diferentes isolados.

Legenda da constituição dos meios: 1- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N + P, 2- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + N, 3- $\frac{1}{2}$ de ALA + C + P, 4- $\frac{1}{2}$ de ALA + C, 9- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N + P, 10- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + N, 11- $\frac{1}{4}$ de ALA + C + P, 12- $\frac{1}{4}$ de ALA + C.

Produção de ramnolípidos em meios de água de azeitona

Os resultados da quantificação de ramnolípidos e a avaliação do efeito tensioativo nas culturas dos diferentes isolados cultivados em meios preparados a partir de ALA com ou sem adição de fontes suplementares de carbono orgânico, azoto e fósforo, são apresentados na tabela 8. As concentrações máximas de ramnolípidos, avaliadas pelo método do orcinol, foram detetadas em meios preparados com ALA $\frac{1}{4}$ adicionado de C e N nos isolados 5, 7 e 27, com C e P no isolado 74. A produção de biossurfactante para os isolados testados é afectada pela composição do meio, isto é, depende das fontes presentes no meio (ANOVA II, $p < 0.05$). O maior efeito tensioativo, avaliado pelo método do colapso da gota (Figura 27) foi detetado nos meios preparados com ALA $\frac{1}{2}$ adicionado de C (isolado 5), C, N e P (isolado 7) ou de C e N (isolado 27), no meio preparado com ALA $\frac{1}{4}$ adicionado de C (isolado 74).

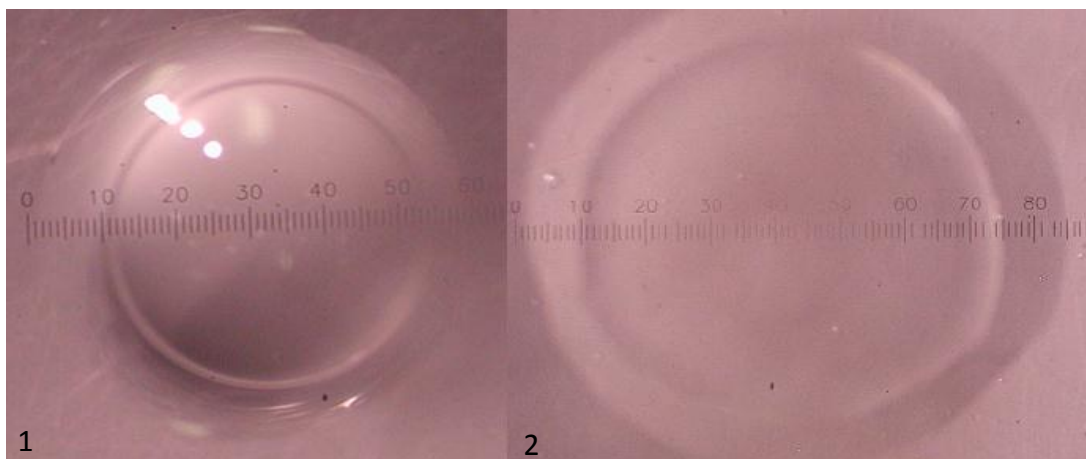


Figura 27- Método do colapso da gota: efeito da redução da tensão superficial.

1) Controlo negativo (*Escherichia coli* α DH5), 2) Ação do biosurfactante produzido pelos isolados.

A menor produção de ramnolípidos e o menor efeito tensioativo foi de uma forma geral, observado nos meios em que não houve adição de uma fonte suplementar de carbono orgânico. Os resultados dos dois métodos não foram estritamente concordantes, uma vez, que a concentração máxima de ramnolípidos e o maior efeito tensioativo não foram, em nenhum caso, detetados nas mesmas condições cultura.

Tabela 5 - Produção de biosurfactantes pelos isolados 5, 7, 24 e 74 cultivados em meios preparados com ALA, avaliada diretamente pelo método do orcinol (equivalentes de ramnose) e pelo método do colapso da gota (equivalentes de SDS). Valores médios de 3 réplicas analíticas.

| # Meio | | Isolado 5 | | Isolado 7 | | Isolado 27 | | Isolado 74 | |
|--------|----------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| | | Orcinol mgL ⁻¹ | Gota mM | Orcinol mgL ⁻¹ | Gota mM | Orcinol mgL ⁻¹ | Gota mM | Orcinol mgL ⁻¹ | Gota mM |
| 1 | ½ de ALA + C + N + P | 0,794 | 10,00 | 0,654 | 14,89 | 0,918 | 9,23 | 0,997 | 10,00 |
| 2 | ½ de ALA + C + N | 0,484 | 9,06 | 0,536 | 10,00 | 0,744 | 14,89 | 0,699 | 11,80 |
| 3 | ½ de ALA + C + P | 0,654 | 9,74 | 0,505 | 9,74 | 0,785 | 9,74 | 0,696 | 11,29 |
| 4 | ½ de ALA + C | 0,534 | 11,80 | 0,614 | 10,16 | 0,618 | 8,72 | 0,778 | 12,14 |
| 5 | ½ de ALA + N + P | 0,166 | 2,55 | 1,051 | 0,40 | 0,328 | 6,66 | 0,524 | 5,63 |
| 6 | ½ de ALA + N | 0,125 | 6,15 | 0,870 | 3,23 | 0,477 | 0,00 | 0,666 | 4,09 |
| 7 | ½ de ALA + P | 0,300 | 5,63 | 0,278 | 1,52 | 0,682 | 2,55 | 0,512 | 5,63 |
| 8 | ½ de ALA | 0,538 | 0,02 | 0,529 | 4,60 | 0,246 | 3,57 | 0,179 | 5,12 |
| 9 | ¼ de ALA + C + N + P | 0,815 | 11,39 | 1,521 | 12,49 | 1,671 | 12,42 | 1,671 | 10,26 |
| 10 | ¼ de ALA + C + N | 1,877 | 10,57 | 2,139 | 12,32 | 1,808 | 13,34 | 1,260 | 15,91 |
| 11 | ¼ de ALA + C + P | 0,907 | 10,57 | 1,620 | 12,49 | 1,536 | 11,54 | 2,000 | 13,86 |
| 12 | ¼ de ALA + C | 0,354 | 9,74 | 0,636 | 8,72 | 0,596 | 12,32 | 0,920 | 16,94 |
| 13 | ¼ de ALA + N + P | 0,205 | 0,00 | 0,832 | 5,63 | 0,687 | 3,57 | 0,687 | 3,57 |
| 14 | ¼ de ALA + N | 0,285 | 4,60 | 0,470 | 0,49 | 0,306 | 6,66 | 0,247 | 0,00 |
| 15 | ¼ de ALA + P | 0,402 | 6,45 | 0,000 | 2,03 | 1,491 | 0,00 | 0,678 | 4,60 |
| 16 | ¼ de ALA | 0,341 | 3,57 | 0,064 | 0,49 | 0,150 | 5,63 | 0,112 | 5,63 |

Discussão

Discussão

O género *Pseudomonas*, caracteriza-se pela sua elevada adaptabilidade a ambientes hostis, apresentando elevado potencial na biodegradação de contaminantes, desempenhando um papel fundamental como organismo decompositor. Destaca-se a sua elevada versatilidade metabólica, podendo usufruir de uma extensa gama de substratos como fontes de carbono (Prescott *et al*, 2002). Neste estudo utilizou-se um conjunto de estirpes de *Pseudomonas* isoladas da Ria de Aveiro a partir de culturas seletivas contendo substratos hidrofóbicos ricos em hidrocarbonetos como únicas fontes de carbono, cuja capacidade de produção de biossurfactantes tinha sido anteriormente detetada de forma qualitativa (Domingues *et al*, in press).

A água de lavagem de azeitona revelou-se um substrato rico em matéria orgânica, característico neste tipo de água residual (Ferreira *et al.*, 2008), em que a fração proteica foi particularmente importante. Revelou ainda uma concentração apreciável de lípidos e uma concentração muito reduzida de açúcares.

Embora tenha sido sujeito a uma pré-filtração através de um filtro de porosidade 7 µm, considerando a complexidade e a diversidade de compostos orgânicos tipicamente presentes nas águas russas, a água de lavagem de azeitona contém ainda presumivelmente concentrações apreciáveis de matéria orgânica sob a forma de partículas de pequenas dimensões, colóides e compostos orgânicos poliméricos de elevado peso molecular que não podem ser diretamente incorporados pelas bactérias.

Avaliação da actividade enzimática extracelular

A produção de enzimas extracelulares pelos microrganismos, é em parte induzida pela ausência de substratos simples (monómeros) e pela maior disponibilidade de substratos poliméricos (Koch, 1985). Tem especial relevância na obtenção de substratos simples a partir de fontes complexas de matéria orgânica (Harder *et al*, 1983). Assim, os perfis de atividade refletem, em última análise, uma adaptação das células aos substratos disponíveis (Hoppe *et al*, 1998).

Neste estudo, as taxas máximas de atividade enzimática para o conjunto de substratos-fluorogénicos testados foram detetadas no isolado 74, proveniente da rizosfera, revelando uma particular adaptação à hidrólise de compostos de natureza polimérica. A rizosfera é um ambiente enriquecido em compostos orgânicos resultantes da exsudação das raízes onde a interação entre as bactérias e a superfície das raízes envolve também a produção de biossurfactante (Bais *et al*, 2004, Rudrappa *et al*, 2007, Kruijt *et al*, 2009).

A atividade máxima para a β -galactosidase foi detetada no isolado 7, *Pseudomonas* sp. com origem na microcamada superficial da coluna de água e os máximos de atividade proteolítica foram detetados no isolado 5, uma estirpe de *Pseudomonas putida* isolado da mesma matriz ambiental. A microcamada superficial marinha apresenta-se frequentemente enriquecida em matéria orgânica e as comunidades bacterianas que aí se desenvolvem estão particularmente adaptadas à utilização de substratos poliméricos, apresentando taxas de atividade enzimática extracelular superiores às das bactérias da coluna de água subjacente (Santos *et al*, 2011).

Todos os isolados revelaram taxas elevadas de atividade da esterase e da aminopeptidase, o que pode ser interpretado como a capacidade apresentada pelos diferentes isolados para utilizar proteínas e gorduras contendo ligações éster presentes na água de lavagem de azeitonas como substratos para o crescimento.

Crescimento em meios de água de azeitona

As bactérias testadas só conseguiram crescer em meios formulados a partir de água de lavagem de azeitona quando foi adicionado extrato de levedura como fonte suplementar de carbono orgânico. Como referido anteriormente, o conteúdo em açúcares é muito baixo neste tipo de água residual. Nos meios não suplementados com extrato de levedura, as bactérias mantiveram-se viáveis por períodos de 1 semana e com capacidade para formar colónias quando semeadas em TSA (triptic soy agar). No entanto, não houve aumento da D.O.₆₀₀ nas culturas em meio líquido, o que indica que não conseguiram crescer. Embora o extrato de levedura seja rico em azoto, contém quantidades apreciáveis de açúcares poliméricos, particularmente glucanos da parede

celular das leveduras. Este suplemento permitiu o crescimento de todas as estirpes testadas.

A maioria dos isolados apresentou taxas de crescimento específicas mais elevadas nos meios que continham para além de uma fonte adicional de carbono orgânico, suplementos de N e P. Adição de P parece ter sido determinante no arranque do crescimento associado à passagem da fase lag à fase exponencial. A adição de N resultou em maior produção de ramnolípidos. Assim, o cultivo destas bactérias em água de lavagem de azeitona com o objetivo de produzir ramnolípidos implica a adição combinada de suplementos de C, N e P. A proporção de ALA usada ($\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ do volume total) não influenciou o crescimento, na generalidade das condições testadas, uma vez que os suplementos foram provavelmente suficientes para compensar o efeito da diluição. No entanto, o isolado 7 *Pseudomonas sp.*, exibiu uma taxa de crescimento mais elevada no meio contendo menor proporção de ALA. Este efeito pode estar associado à menor concentração de compostos fenólicos que podem apresentar toxicidade para alguns microrganismos (Morillo *et al*, 2007). O isolado 5, *Pseudomonas putida* revelou taxas de crescimento específicas bastante homogêneas independentemente da composição do meio, sendo os valores obtidos neste estudo da mesma ordem dos obtidos num substrato rico em fenol (Monteiro *et al*, 2000).

Produção de ramnolípidos em meios de água de azeitona

No sentido de tornar menos dispendiosa a produção de biossurfactantes têm sido testados com sucesso resíduos de baixo custo da indústria de óleos alimentares, ricos em ácidos gordos necessários à síntese da fração lipídica dos biossurfactantes (Makkar *et al*, 2011). Ao contrário do que acontece com a divisão celular associada ao crescimento bacteriano, a produção de ramnolípidos, ocorre essencialmente durante a fase estacionária e apresenta a mesma exigência nutricional. Mesmo sem adição de extrato de levedura como fonte suplementar de carbono, houve produção de pequenas quantidades de biossurfactante ainda que após períodos de incubação muito mais longos do que nos meios suplementados. Das 16 formulações baseadas em água de lavagem de azeitona, apenas foi detetado crescimento das estirpes de *Pseudomonas* nas 8 em que houve

adição de carbono orgânico, sendo também nestas registada a maior produção de biossurfactante. Os processos biotecnológicos de produção de ramnolípidos implicam normalmente a imposição de uma limitação nutricional controlada, exercida pela redução da disponibilidade de azoto, fósforo, ou iões multivalentes combinada com um excesso de carbono (Guerra-Santos *et al*, 1986, Arino *et al*, 1996). Um rácio C:N elevado é normalmente um dos requisitos na produção de biossurfactantes (Santa Anna *et al*, 2002). No entanto, neste trabalho, a produção de ramnolípidos foi maior em meios suplementados com C e N, tal como reportado noutros estudos (Guerra-Santos *et al*, 1984). A água de lavagem de azeitonas contém concentrações apreciáveis de proteína mas é pobre em açúcares e a limitação excessiva de nutrientes pode inibir a produção de biossurfactante (Ballot, 2009).

O fator diluição (proporção de água de lavagem de azeitona no meio de cultura) afetou a produção de biossurfactantes. As maiores concentrações de ramnolípidos ($\geq 1,00 \text{ mg L}^{-1}$) foram registadas nos meios contendo ALA $\frac{1}{4}$ e suplementos de C e N ou C, N e P. Este efeito pode estar relacionado com a diluição de compostos inibidores presentes na água de lavagem de azeitona. Nos meios não suplementados com carbono orgânico a produção de ramnolípidos geralmente baixa e o efeito tensioativo também é reduzido.

Os resultados da produção de biossurfactantes expressos avaliados pela produção de ramnolípidos ou pelo efeito tensioativo não são rigorosamente concordantes porque constituem abordagens diferentes, sendo o método do orcinol uma medida mais rigorosa, dado que é uma quantificação directa. Enquanto que a quantificação de ramnose dá indicação da concentração do produto, o teste do colapso da gota dá indicação da atividade da molécula ou mistura de moléculas que depende, entre outros fatores, do tamanho e grau de ramificação do lípido da cauda. Assim, diferentes estirpes em diferentes substratos, podem resultar num biossurfactante com propriedades distintas (Zhang e Miller, 1994, Perfumo *et al*, 2006). De todas as combinações testadas, a mais promissora para a generalidade dos isolados pela quantidade de ramnolípidos produzida, foi a correspondente ao meio 10 que combina a maior diluição de ALA com a adição de carbono orgânico e azoto.

As concentrações de ramnolípidos registadas neste estudo são comparáveis com as obtidas em trabalhos análogos com outro tipo de substratos, meios contendo hidrocarbonetos ou resíduos agroindustriais (Tuleva *et al*, 2002, Lotfabad *et al*, 2009, Sahoo *et al*, 2011, Saravanan e Vijayakumar, 2012). No entanto são ainda relativamente escassos os relatos da utilização de resíduos industriais como substratos para a produção ramnolípidos.

Efeito da salinidade na produção de biossurfactante

Como referido anteriormente existem vários fatores que controlam a síntese de biossurfactantes. Destes, destacam-se a qualidade e quantidade das fontes de carbono, a disponibilidade de azoto e a concentração de sal (Desai e Banat, 1997).

A concentração em sal afetou significativamente o desempenho das estirpes de *Pseudomonas* envolvidas neste estudo, em termos de produção de ramnolípidos. A concentração máxima testada (30 g L^{-1}) causou uma redução de 62% a 68% na produção de ramnolípidos. O efeito foi particularmente acentuado para valores iguais ou superiores a 20 g L^{-1} , sendo este resultado coincidente com os obtidos com outras bactérias produtoras de biossurfactantes (Thimon *et al*, 1992) Os isolados usados neste estudo têm origem numa secção da Ria de Aveiro com salinidades intermédias (Domingues *et al*, in press) e são provavelmente bactérias halotolerantes capazes de sobreviver às variações tidais da salinidade características dos ambientes estuarinos. Assim, e apesar de se verificar uma redução da produção de biossurfactante para os valores de salinidade mais elevados, a relativa tolerância ao sal é compatível com a utilização de águas de lavagem de azeitona mesmo que contaminadas com resíduos de salmoura. A água usada neste trabalho apresentou salinidade de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ que fica abaixo do valor a partir do qual se detetou inibição da produção de ramnolípidos. No entanto, em caso de concentrações mais elevadas de sal, a diluição da água de lavagem de azeitona, pode ser vantajosa atenuando o efeito negativo da salinidade sobre a produção de biossurfactante e diluindo outras substâncias inibidoras presentes.

Conclusão

Conclusão

A utilização de águas residuais do processamento de azeitona de mesa para o cultivo de bactérias produtoras de ramnolípidos, avaliada neste estudo, mostrou-se uma abordagem promissora mas que requer ainda otimização e investigação mais detalhada quanto aos suplementos a utilizar. No entanto, o alargamento do estudo a fontes pouco dispendiosas de carbono, azoto e fósforo pode resultar em meios de cultivo não convencionais que satisfaçam os requisitos nutricionais dos microrganismos, reduzam os custos de produção e constituam até uma alternativa para o tratamento ou valorização de resíduos industriais ricos em matéria orgânica.

Referências

Referências bibliográficas

Alemzadeh I, Nazemi A R (2006) Physico-chemical and biological treatment of olive mill wastewater by rotating biological contactor (RBC) reactors. *Iranian Journal and Chemical Engineering* 25(4): 47-53.

Al-Mallah M, Goutx M, Mille G, Bertrand J C (1990) Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in sea water with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon. *Oil and Chemical Pollution* 6 (4):289–305.

Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31(3):488–494.

Arino S, Marchai R, Van Decasteel J P (1996) Identification and Production of a Rhamnolipidic Biosurfactant by a *Pseudomonas* Species. *Applied Microbiology Biotechnology* 45: 162-168.

Bais H P, Fall R, Vivanco J M (2004) Biocontrol of *Bacillus Subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas Syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiology* 134(1):307-19.

Ballot F (2009) Bacterial production of antimicrobial biosurfactants. *MScEng thesis*. University of Stellenbosch.

Bamforth S M, Singleton I (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80(7): 723-736.

Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M, Fracchia L, Smyth T J , Marchant R (2010) Microbial Biosurfactants Production, Applications and Future Potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(2):427-44.

Banat I M, Makkar R S, Cameotra S S (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(5): 495-508.

Barros F F C, Quadros C P (2008) Propriedades emulsificantes e estabilidade de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28 (4): 979-985.

Barros F F C, Quadros C P (2007) Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quimica Nova* 30(2): 409-414.

Batista S, Mounteer A, Amorim F, Tótola M R (2006) Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology* 97(6):868–875.

Ben Othman N, Roblain D, Chammen N, Thonart P, Hamdi M (2009) Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry* 116(3): 662-669.

Bento F M, Camargo F A O, Okeke B C, Frankkenberger W T (2005) Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96: 1049–1055.

Bianchi G (2003) Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105: 229-242.

Bondarenko O, Rahman P K, Rahman T J, Kahru A, Ivask A (2010) Effects of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 on luminescent bacteria: Toxicity and modulation of cadmium bioavailability. *Microbial Ecology* 59(3): 588-600.

Bodour A A, Miller-Maier R M (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 32(3):273-280.

Boskou D (2006) *Olive Oil: Chemistry and Technology*. American Oil Chemists Society. AOCS Press, ISBN 189399788X.

Candeias A C (1996) A aplicabilidade da tecnologia da compostagem no tratamento e valorização de resíduos orgânicos – contributo para a sua validação no sector dos lagares de azeite. – Dissertação de fim de curso de engenharia agro-industrial, UTL, ISA, Lisboa, 75p.

Christofi N, Ivshina I B (2002) Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology* 93: 915-929.

Conde C, Delrot S, Gerós H (2008) Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology* 165 (15): 1545-1562.

Contiero, J. (2008). *Produção e Aplicações de Biossurfactantes*. Rio Claro, Laboratório Microbiologia Industrial - Instituto Biociências Campus de Rio Claro UNESP.

Costa S G V A O, Nitschke M (2010). "Structure properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater." *Process Biochemistry* 45: 1511-1516.

Davis D A, Lynch H C (1999). The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 322-329.

De Marco E; Savarese M; Paduano A; Sacchi R (2007) Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* 104: 858–867.

Desai J D, Banat I M, (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1): 47-64.

Dias J M, Lopes J F, Dekeyser I (2000) Tidal propagation in the Ria de Aveiro lagoon, Portugal. *Physics and Chemistry of the Earth* 25: 369–374.

Domingues P M, Louvado A, Oliveira V, Coelho F J, Almeida A, Gomes N C M, Cunha A Selective cultures for the isolation of biosurfactant producing bacteria: comparison of environmental inocula and hydrophobic carbon sources. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* (in press) DOI:10.1080/10826068.2012.719848.

Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 28(3):350-356.

Enfors S, Molin G, Ternstrom A (1979) Effect of packaging under carbon-dioxide, nitrogen or air on the microbial-flora of pork stored at 4°C. *Journal of Applied Bacteriology* 47(2):197–208.

Ferreira F, Carvalho L, Pereira R, Antunes S C, Marques S M, Gonçalves F, Duarte A C, Rocha-Santos T A P, Freitas A C (2008) Biological and photo-fenton treatment of olive oil mill wastewater. *Global Nest Journal* 10(3): 419-425.

Fard S (2010) Production and purification of biosurfactants and study of their influence on surface properties of stainless steel and Teflon, in *Science and Technology - Laboratory ProBioGEM*, University of Lille 1: France.

Garrido-Fernández A, Fernandez Dýez M J, Adams M R (1997) Table olive. *Production and Processing*. Chapman & Hall, London 134–197.

Gómez A H S, Garcia P G, Navarro L R (2006) Trends in table olive production. *Elaboration of table olives*. *Grasas y Aceites* 57: 86-94.

Greco Jr G, Colarieti M L, Toscano G, Iamarino G, Rao M A, Gianfreda L (2006) Mitigation of olive mill wastewater toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6776–6782.

Guerra-Santos L H, Kapelli O, Fiechter A (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology Biotechnology* 24: 443-448.

Guerra-Santos L H, Kapelli O, Fiechter A (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 301-305.

Harder W, Dijkhuizen L (1983) Physiological Responses to Nutrient Limitation. *Annual Review of Microbiology* 37:1-23.

Hommel R (1990) Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon utilizing microorganisms. *Biodegradation* 1: 107–119

Hoppe H G, Giesenhausen H C, Gocke K (1998) Changing patterns of bacterial substrate decomposition in a eutrophication gradient. *Aquatic Microbial Ecology* 15: 1-13.

Kiritsakis A, Koutsaftakis A, Stefanoudaki E, Kostopoulou M, Polymenopoulos Z (2001) Environment Pollution by the waste water of olive oil mills: how to eliminate the problem. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 2(4): 869-873

Kitamoto D, Morita T (2009) Self assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potencial applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14: 315 - 328.

Koch A L (1985) The macroeconomics of bacterial growth. In: M. Fletcher and G.D. Floodgate, eds, *Bacteria in their Natural Environments*, Academic Press, London 1 - 42.

Kronemberger F D A (2007). Produção de Ramnolipideos por PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. COPPE. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro: 153.

Kruijt M, Tran H, Raaijmakers J M (2009) Functional, Genetic and Chemical Characterization of Biosurfactants Produced by Plant Growth-Promoting *Pseudomonas Putida* 267. *Journal of Applied Microbiology*.107(2):546-56.

Lin S C, Lin K G, Lo C C, Lin Y M (1998) Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 267-273,

Loftabad T B, Shoushtarian M, Roostaazad R, Najafabadi A R, Adelzadeh M R, Noughabi K A (2009). An efficient biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas*

aeruginosa MR01 isolated from oil excavation areas in south of Iran. Colloids surfaces and Biointerfaces 69(2):183-193.

Louvado A, Coelho F J R C, Domingues P, Gomes N C M, Santos A L, Almeida A, Cunha A (2012) Isolation of Surfactant-Resistant Pseudomonads from the Estuarine Surface Microlayer. Journal of Microbiology and Biotechnology 22(3): 283–291.

Lu J R, X B Zhao, Yaseen M (2007) Biomimetic amphiphiles: Biosurfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science 12(2): 60-67.

Maier R M, Soberón-Chávez G (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Applied Microbiology Biotechnology 54: 625-633.

Makkar R S, Cameotra S S, Banat I M (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express 1-5.

Makkar R S, Cameotra S S (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 428 - 434.

Makkar H P S, Aderibigbe A O, Becker K (1998) Comparative evaluation of non-toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry 62: 207-215.

Malheiro R M (2010) Influência da cultivar nas características físico-químicas, sensoriais e biológicas de azeitonas verdes descaroçadas. – Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, Escola Superior Agrária, Bragança, 120 p.

Maneerat S (2005) Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin Journal of Scientific Technology 27(3): 675-683.

Martins V G, Kalil S J (2008). "Co-produção de lipases e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos." Quimica Nova 31(8): 1942 - 1947

Mata-Sandoval J C, Karns J, Torrent A (2001) Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. Microbiological Research 155: 249–256.

Monteiro A M G, Boaventura R A R, Rodrigues A E (2000) Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. The Biochemical Engineering Journal 6 (1): 45–49.

Morillo J A, del Águila V G, Aguilera M, Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sánchez M (2007) Production and characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill-waste waters. World Journal of Microbiology & Biotechnology 23:1705–1710

Mulligan CN, Gibbs BF (1993) Factors influencing the economics of biosurfactant. In: Kosaric, N. (Ed). Biosurfactant production, properties and application, New York; Mercel Decker pp. 329-371.

Muriel M M, Bruque J M, Olías J M, Jiménez-Sánchez A (1996) Production of biosurfactant by *Cladosporium resinae*. Biotechnology Letters 18(3): 235-240.

Nawawi W M F W, Jamal P (2010) Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. Bioresource Technology 101: 9241 - 9247

Niaounakis M, Halvadakis C P (2006) – Olive processing waste management. Literature review and patent survey. – 2nd ed. – Ed. Elsevier, 498p.

Nitschke M, Costa S G V A O (2007) Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science & Technology 18: 252 - 259.

Nitschke M, Pastore G M (2002) Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova 25: 772-776.

Pacwa-Plociniczak M, Plaza G A, Piotrowska-Seget Z, Cameotra S S (2011) Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. International Journal of Molecular Sciences 12(1): p. 633- 654.

Pattanathu K S M R, Gakpe E (2008) Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review. Biotechnology 7(2): 360-370.

Perfumo A, Banat I M, Canganell F, Marchant R (2006) Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO2- 1. Applied Microbiology Biotechnology 72: 132-138.

Persson A, Molin G (1987) Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. Applied Microbiology and Biotechnology 26(5):439–442

Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology Biotechnology 51(5):553–563.

Prescott L. M, J. P. Harley & D. A. Klein, (2002) *Microbiology*. McGraw-Hill, International edition.

Priya T, Usharani G (2009) Comparative study for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Botany Research International 2(4): 284 - 287.

Rizzi A, Zucchi M, Borin S, Marzorati M, Sorlini C, Daffonchio D (2006) Response of methanogen populations to organic load increase during anaerobic digestion of olive mill wastewater. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 81:1556–1562

Robert M, Mercadé M E, Bosch M P, Parra J L, Espuny M J, Manresa A, Guinea J (1989) Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnology Letters 11: 871-874 1989.

Rodis P S, Karathanos V T, Mantzavinou A (2002) Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 596–601;

Ron E Z, Rosenberg E (2001) Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology 3(4): 229-236

Rosenberg E, Ron E Z (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiology Biotechnology 52: 154–162.

Rosenberg E, Ron E Z (1997) Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. Current Opinion in Biotechnology 8:313-316

Rosen M J (1978) Surfactants and interfacial phenomena / Milton J. Rosen. New York :Wiley.

Rudrappa T, Quinn W, Stanley-Wall N, Bais H (2007) A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus Subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis Thaliana* Roots. *Planta* 226(2):283-297.

Ryan M, Robards K (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123: 31-44

Saadi I, Laor Y, Raviv M, Medina S (2007) Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere* 66 (1):75–83.

Sahoo S, Datta S, Biswas D (2011) Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. *Journal of advanced Scientific Research* 2(3):32-36

Sakouhi F; Harrabi S; Absalon C; Sbei K; Boukhchina S, Kallel H (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry* 108: 833-839

Sánchez A H, de Castro A, Rejano L, Montaña A (2000) Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5975-5980.

Santa-Anna L M, Sebastian G V, Menezes E P, Alves T L M, Santos Â S, Pereira Jr N, Freire D M G (2002) Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19(2): 159-166

Santos L, Santos A L, Coelho F J R C, Gomes N C M, Dias J M, Cunha Â, Almeida A (2011) Relation between bacterial activity in the surface microlayer and estuarine hydrodynamics. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 636-646.

Saravanan V, Vijayakumar S (2012) Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *Journal of Academia and Industrial Research* 1(5).

Shepherd R, Rockey J, Sutherland IW, Roller S (1995) Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology* 40(3):207–217

Showell M S (2006) *Handbook of Detergents. Part D: Formulation*. U.S.A.: Taylor & Francis Group.

Soberón-Chávez G; Lépine F; Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology* 68: 718-725,

Speight J G (2007) *The Chemistry And Technology of Petroleum*. 4th edition CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.

Thimon L, Peypoux F, Magetdana R, Michel G (1992) Surface-active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus-subtilis*. *Journal of the American Oil Chemhists' Society* 69:92-93

Thimon L, Peypoux F, Wallach J, Michel G (1995) Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters* 128:101-106

Tuleva B K, Ivanov G R, Christova N E (2002) Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 57: 356-360.

Van Hamme J D, Singh A, Ward O P (2006) Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances* 24(6): p. 604-620.

Vater J (1986) Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. Progress in Colloid and Polymer Science 72:12-18

Volkerling F, Breure A M, Van Andel J G, Rulkens W H (1995) Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology 61: 1699–1705

Wang Y, Ou S, Liu P, Zhang Z (2007) Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. Energy Conversion and Management 48 (1): 184–188,.

Warren M W, Brown H G, Davis D R (1988) Solvent Extraction of Lipid Components From Egg Yolk Solids. Journal of the American Oil Chemists' Society 65 (7):1136-1139

Web (accedidos a 5/12/12): <http://commercial-cleaning-products.com/cleaning-chemicals/chemistry-works-how-do-cleaning-products-work> ;
<http://www.attension.com/critical-micelle-concentration>.

Wei Y H, Chou C L, Chang J S (2005) Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal 27: 146–154.

Wilson K, Walker J (2000) Principles and techniques of practical biochemistry. 7th ed., London: Cambridge University Press.

Wittgens A, Tiso T, Arndt T T, Wenk P, Hemmerich J, Muller C, Wichmann R, Kupper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Syltatk C, Rosenau F, Blank L M (2011) Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. Microbial Cell Factories 10(80): 1-53

Ying G G (2006) Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International* 32(3): 417 – 431.

Zhang Y, Miller R M (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* 60(6):2101–2106.

